



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Guilherme da Silva de Medeiros

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E
DE ÍNDICES DE DANO AO DNA EM AMOSTRAS DE SANGUE
PERIFÉRICO DE PACIENTES EM CRISE CIRRÓTICA
ATENDIDOS NA EMERGÊNCIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

Florianópolis

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Medeiros, Guilherme

AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E
DE ÍNDICES DE DANO AO DNA EM AMOSTRAS DE SANGUE
PERIFÉRICO DE PACIENTES EM CRISE CIRRÓTICA ATENDIDOS
NA EMERGÊNCIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA / Guilherme
Medeiros ; orientador, Sharbel Weidner Maluf, 2017.
83 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,
2017.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Estresse Oxidativo. 3. Dano ao
DNA. 4. Cirrose. I. Weidner Maluf, Sharbel. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Guilherme da Silva de Medeiros

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E
DE ÍNDICES DE DANO AO DNA EM AMOSTRAS DE SANGUE
PERIFÉRICO DE PACIENTES EM CRISE CIRRÓTICA
ATENDIDOS NA EMERGÊNCIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Sharbel Weidner Maluf

Banca examinadora:

Prof^a. Dra Arianne Zamoner Pacheco de Souza

Prof^a. Dra Evelise Maria Nazari

Dr. Eduardo Benedetti Parisotto

Florianópolis, 2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha família e à minha namorada, que sempre me apoiaram desde que entrei na vida acadêmica em 2010;

Agradeço ao meu orientador, Dr. Sharbel Weidner Maluf, e aos meus colegas de laboratório, que principalmente nos últimos 2 anos tem me dado uma imensa ajuda, sem a qual certamente eu não seria capaz de concluir este trabalho;

Agradeço aos demais colegas de academia, cuja ajuda também foi de fundamental importância para a realização das coletas e dos experimentos que fundamentaram todo o meu trabalho;

Agradeço aos amigos, os quais também me deram apoio e força nos momentos que precisei;

Agradeço a todos, de forma geral, que contribuíram para que este trabalho fosse concluído, inclusive me impedindo de desistir quando tudo estava dando errado e quando o arrependimento era forte. Hoje posso dizer que seguir com este trabalho foi uma decisão sábia, mesmo com todas as dificuldades enfrentadas;

Agradeço à UFSC, ao PGFar e às agências de fomento que fazem com que seja possível fazer pesquisa no Brasil;

A todos, meu muito obrigado.

RESUMO

O fígado é um órgão central do metabolismo humano, sendo responsável por mais de uma centena de funções que garantem a homeostase do indivíduo. O principal tipo celular que exerce essas funções é o hepatócito. A cirrose é uma condição extrema que acontece quando os hepatócitos começam a morrer e são substituídos por uma matriz de colágeno, que não exerce função nenhuma. Esta morte pode ser causada por diversos fatores, como infecções virais, abuso crônico de álcool, desordens autoimunes entre outros. Nesta condição, o fígado perde a capacidade de realizar suas funções adequadamente, causando graves danos sistêmicos ao indivíduo, levando inclusive a óbito. Neste trabalho foram analisadas amostras de sangue periférico de 62 indivíduos em crise cirrótica, e comparou-se esses resultados com 35 indivíduos saudáveis, a fim de obter resposta se há ou não diferença entre os grupos no que diz respeito a marcadores de dano ao DNA e de estresse oxidativo. Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos nos parâmetros Dano Cometa ($p < 0,001$), Número de Micronúcleos ($p = 0,002$), Número de Pontes Nucleoplasmáticas ($p < 0,001$), Número de Brotos Nucleares ($p = 0,003$) e concentração de Substâncias que Reagem com o Ácido Tiobarbitúrico (TBARS, $p = 0,012$). Os resultados indicam que os pacientes apresentaram uma instabilidade genômica sistêmica, associada a um desequilíbrio oxidativo e reforça a ideia de que as técnicas utilizadas podem ser bons marcadores a serem utilizados como prognóstico para a condição dos indivíduos cirróticos.

Palavras-Chave: Cirrose; Dano ao DNA; Estresse Oxidativo; Técnica Cometa; Técnica do Micronúcleo.

ABSTRACT

The liver is a central organ of metabolism, accounting for more than a hundred functions that guarantee the individual's homeostasis. The main cellular type that performs these functions is the hepatocyte. Cirrhosis is an extreme condition that occurs when the hepatocytes begin to die and are replaced by a matrix of collagen, which has no function at all. This death can be caused by several factors, such as viral infections, chronic alcohol abuse, autoimmune disorders, among others. In this condition, the liver loses the ability to perform its functions properly, causing serious systemic damage to the individual, leading to death. In the present study, peripheral blood samples from 62 individuals in a cirrhotic crisis were analyzed, and these results were compared with 35 healthy individuals in order to obtain a response whether or not there was a difference between the groups to markers of DNA damage and oxidative stress. Significant differences were found between groups in the Comet Assay ($p < 0,001$), Number of Micronuclei ($p = 0,002$), Number of Nucleoplasmic Bridges ($p < 0,001$), Number of Nuclear Buds ($p = 0,003$) and values of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS, $p = 0,012$). The results show that the patients presented systemic genomic instability, associated with an oxidative imbalance, and reinforces the idea that the techniques used may be good markers of prevention of worsening of the disease in patients with cirrhosis.

Keywords: Cirrhosis; DNA damage; Comet Assay; Micronucleus Assay; Oxidative Stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tabela de danos do ensaio cometa.....	33
Figura 2: Principais observções de dano detectados pela técnica do micronúcleo.....	34
Figura 3: Distribuição dos pacientes de acordo com a etiologia da sua doença.	48
Figura 4: Relação entre o álcool e o sexo dos indivíduos do grupo de estudo.	49
Figura 5: Distribuição da etiologia "álcool" dentre os sexos no grupo de estudo.	49
Figura 6: Números relacionados ao tabagismo no grupo de estudo.	50
Figura 7: Distribuição dos sexos em relação ao tabagismo no grupo de estudo.	51
Figura 8: Valores de mediana, quartis e limites da variável número de micronúcleos	53
Figura 9: Imagens de micronúcleos (setas) encontrados no grupo de pacientes.....	54
Figura 10: Valores de mediana, quartis e limites da variável número de pontes nucleoplasmáticas.	55
Figura 11: Imagens de pontes nucleoplasmáticas (setas) encontradas no grupo de pacientes.....	55
Figura 12: Valores de mediana, quartis e limites da variável número de brotos nucleares.	57
Figura 13: Imagens de brotos nucleares (setas) encontrados no grupo de pacientes.....	57
Figura 14: Gráfico de média e desvio padrão da variável Índice Mitótico.	58
Figura 15: Gráfico indicando a mediana, quartis e limites da variável dano total ao DNA.	59
Figura 16: Gráfico indicando as porcentagens de cada classe de dano encontrado no teste cometa.	60
Figura 17: Gráfico indicando a mediana, quartis e limites da variável TBARS.....	61
Figura 18: Gráfico indicando a mediana, quartis e limites da atividade da catalase.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela de correlações encontradas.....63

Tabela 2:: Valores estatísticos encontrados em ambos os grupos.....64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS – Organização Mundial da Saúde

HBV – Vírus da Hepatite B

DST – Doenças sexualmente transmissíveis

HCV – Vírus da Hepatite C

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

ERNs – Espécies Reativas de Nitrogênio

O₂[•] – Radical Superóxido

HO₂[•] – Radical Hidroperoxila

OH[•] – Radical Hidroxila

SOD – Superóxido Dismutase

Cat – Catalase

GPx – Glutathione Peroxidase

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

H₂O – Água

O₂ – Oxigênio Molecular

HU-UFSC – Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago

TBARS – Substâncias que Reagem com o Ácido Tiobarbitúrico

CEPSH – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
2.1	Anatomia, Histologia e Fisiologia do Fígado	25
2.2	Quadro Cirrótico.....	26
2.3	Dano Sistêmico Relacionado ao Quadro Cirrótico	28
2.4	Sangue	29
2.5	Estresse Oxidativo	29
2.6	Dano ao DNA	31
2.7	Resposta Imune do Fígado e Inflamação	35
2.8	Relação entre Estresse Oxidativo e Dano ao DNA.....	36
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo geral	37
3.2	Objetivos específicos.....	37
4	SUJEITOS E MÉTODOS	39
4.1	Ensaio cometa.....	40
4.2	Técnica de micronúcleos com o bloqueio da citocinese celular	41
4.3	TBARS	43
4.4	Catalase	44
4.5	Análise Estatística	44
4.6	Aspectos Éticos	44
5	RESULTADOS	47
5.1	Características Descritivas.....	47
5.2	Estatística Indutiva	51
5.2.1	Micronúcleos, Pontes Nucleoplasmáticas e Brotos Nucleares...	52
5.2.2	Índice Mitótico.....	58
5.2.3	Teste Cometa.....	59
5.2.4	TBARS.....	60
5.2.5	Catalase.....	61

5.2.6	Correlações.....	63
6	DISCUSSÃO	65
7	CONCLUSÕES.....	73
	BIBLIOGRAFIA.....	75
	ANEXOS.....	83
	Anexo 1.	83

1 INTRODUÇÃO

O fígado é considerado um órgão central do metabolismo (Aumüller *et al.*, 2009). Ele possui mais de uma centena de funções, que vão desde produzir a bile que atuará no auxílio da digestão de lipídeos (Jurica *et. al.*, 2016), passando pela produção de hormônios e outras substâncias (Jelkmann, 2001) e também como agente biotransformador de substâncias que entram no organismo pelo trato digestório (Gallego *et. al.*, 2002). O tipo celular que realiza a maior parte das funções do órgão é o hepatócito, uma célula grande, de até 40 micrômetros, muitas vezes binucleada e rica em organelas (Krishna, 2013). Além dos hepatócitos, há outros tipos celulares muito importantes para a homeostase do órgão, como as “Pit cells”, que são macrófagos específicos do fígado, responsáveis pela imunidade inata do órgão e suas implicações. Ainda, outro tipo celular importante são as Células de Ito, que têm por função o armazenamento de lipídeos, além de secretarem colágeno no processo cirrótico (Wisse *et al.*, 1997; Peng; Wisse; Tian, 2015).

O processo cirrótico tem o seu início através da morte dos hepatócitos, que ao invés de serem substituídos por novos hepatócitos viáveis, são substituídos por colágeno. Com o passar do tempo e com a morte progressiva de hepatócitos, o fígado adquire um aspecto fibroso, perdendo seu arcabouço natural e não conseguindo mais realizar normalmente as suas funções, ocasionando danos sistêmicos graves, que podem levar o indivíduo a óbito. Esta morte dos hepatócitos pode ser em decorrência de vários fatores distintos, mas as principais causas são o consumo abusivo de álcool diariamente e por um longo período de tempo (Jinjuvadia, 2015), a infecção pelo vírus da hepatite B e a infecção pelo vírus da hepatite C. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que só por esses dois vírus, 400 milhões de pessoas no mundo estejam contaminadas, com uma estimativa de 1,4 milhões de mortes anuais. O consumo

pesado de álcool, ainda segundo dados da OMS, é responsável direto por cerca de 3,3 milhões de mortes por ano. Desta forma, o conhecimento correto acerca dos mecanismos, consequências e dos dados sobre esta condição podem ser considerados como questão de saúde pública.

Estudos prévios começam a indicar uma ligação entre o desenvolvimento da doença e diversos efeitos sistêmicos que prejudicam a qualidade de vida do indivíduo, inclusive através do agravamento da condição, e que em última instância levam o indivíduo a óbito. Está começando a se relacionar o desenvolvimento da doença com maiores índices de dano ao DNA, maior exposição ao estresse oxidativo (Galicia-Moreno e Gutiérrez-Reyes, 2014), maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes na corrente sanguínea (Clària *et al.*, 2016), entre outros efeitos.

Estes três fatores (dano ao DNA, estresse oxidativo e inflamação) estão intimamente relacionados entre si e com o desenvolvimento da cirrose. Está consolidada a informação que o fígado de um paciente cirrótico possui uma inflamação crônica, com seu sistema de defesa estando permanentemente ativado e levando à uma grande produção de citocinas pró-inflamatórias (Clària *et al.*, 2016). Esta inflamação crônica, por sua vez, relaciona-se com uma maior produção de radicais livres, o que leva ao cenário chamado de estresse oxidativo, cenário capaz de contribuir para a morbidade da doença e também para seu desenvolvimento, pois este pode ser responsável pela morte de mais hepatócitos e dos efeitos decorrentes desta morte (Pena *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

Por fim, ambos os cenários (inflamação crônica e estresse oxidativo) estão relacionados a maiores índices de dano ao DNA. O DNA é a molécula mais importante da célula, que serve de base para a correta produção e funcionamento de toda a maquinaria e estrutura celular. Danos ao material genético são bastante graves, e podem levar à morte celular e ao desenvolvimento de cânceres

(O'Connor, 2015). Por este motivo, a inflamação crônica e ao estresse oxidativo crônico e sistêmico começam a ser creditados parte importante na morbidade da cirrose (Czaja, 2014).

A partir deste cenário, o presente estudo propõe-se a responder algumas perguntas acerca do estado oxidativo e dos níveis de dano de DNA em pacientes em crise cirrótica grave, atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina e, a partir dos resultados, discutir possíveis respostas.

Quando os pacientes cirróticos davam entrada na emergência do HU-UFSC, amostras de sangue periférico eram coletadas para análise. A partir destas amostras, foram analisados cinco marcadores de dano ao DNA e dois marcadores de estresse oxidativo, a fim de verificar se a condição do paciente cirrótico tem alguma influência sistêmica no indivíduo. Ainda, foram feitas análises de correlação a fim de perceber-se ou não a existência de correlações dentre os diversos marcadores e dados obtidos dos indivíduos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Anatomia, Histologia e Fisiologia do Fígado

O fígado é um órgão de consistência macia, coloração marrom brilhante e escura, possuindo entre 1,5 e 2 kg, e sendo assim a maior glândula do corpo humano. Possui duas faces, a face diafragmática, que encontra-se aderida ao diafragma, e a face visceral. Ainda, o fígado encontra-se posicionado na região abdominal superior direita, e, devido à sua aderência ao diafragma, pode se movimentar durante o processo de respiração. Possui proteção da Caixa Torácica. A sua superfície que não encontra-se aderida ao diafragma é revestida por uma camada chamada peritônio visceral, e, devido à consistência macia do órgão, os demais órgãos adjacentes a ele formam impressões características sobre a sua superfície (Abdel-Misih; Bloomston, 2010; Skandalakis *et. al.*, 2004).

Fisiologicamente, a importância do fígado é evidenciada por este ser um órgão central do metabolismo, coletando os nutrientes provenientes do trato digestório através da veia porta do fígado para um novo processamento (Gallego *et. al.*, 2002). Ainda, ele está envolvido na produção de glicogênio, proteínas plasmáticas, ácidos graxos e colesterol, liberando alguns de seus produtos diretamente na corrente sanguínea (Jelkmann, 2001), enquanto que outros, como a bile, é secretada por meio das vias biliares diretamente no intestino delgado (Jurica *et. al.*, 2016). O fígado atua também na detoxificação de substâncias endógenas e exógenas (Almazroo; Miah; Venkataramanan, 2017), tendo um papel central na homeostase do indivíduo (Strnad, 2016).

Histologicamente, os hepatócitos são as células mais importantes do órgão, e que acumulam a maior parte das funções. São células poliédricas, de 25 a 40 µm de diâmetro, e podem possuir mais de um núcleo. Seu citoplasma é rico em organelas, e os hepatócitos podem apresentar diferenças estruturais, histoquímicas e bioquímicas dependendo da sua localização no órgão (Krishna, 2013). Ainda, encontram-se presentes no fígado as Células de Kupffer, as *Pit cells*, as Células de Ito e as Células Ovais. As células de Kupffer são

macrófagos apresentadores de antígenos, e são capazes de realizar fagocitose, podendo fagocitar restos celulares, bactérias e/ou outros corpos estranhos que estejam ali presentes. As *Pit cells* são linfócitos específicos do fígado, tendo papel na imunidade inata local, atuando como *Natural Killers*, além de secretarem citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores celulares – por exemplo, Fator de Necrose Tumoral α -, tendo estas células um importante papel no desenvolvimento da cirrose hepática, entre outros problemas hepáticos (Wisse *et al.*, 1997; Peng; Wisse; Tian, 2015). As Células de Ito são células armazenadoras de lipídios, e são as responsáveis pelo aumento na produção e no depósito extracelular de colágeno característicos do quadro clínico de cirrose hepática. As Células Ovais são caracterizadas como células-tronco, capazes de promover a regeneração do parênquima hepático e das vias biliares intra-hepáticas após graves lesões que porventura acometam o órgão ou após a retirada cirúrgica de parte do fígado (Assy, 1998).

2.2 Quadro Cirrótico

O quadro cirrótico compreende a morte de hepatócitos, que acabam por ser substituídos por estruturas fibrosas que não desempenham a função das células hepáticas originais, acarretando a mudança da arquitetura original do órgão e perda de função do mesmo caso o processo não seja interrompido precocemente. Esta perda de função leva o indivíduo cirrótico a um quadro clínico extremo, podendo acarretar inclusive a morte do indivíduo. Dados retirados do site do Departamento de Informática do SUS (DATASUS) indicam que, apenas no ano de 2010, foram registrados 11.448 novos casos de Hepatite C e 14.979 novos casos de Hepatite B no Brasil. Estima-se que a Cirrose Hepática é a causa de 1,1% de todas as mortes ocorridas no mundo (Silva, 2010).

A cirrose hepática pode ser decorrente de diversas causas, sendo as causas mais prevalentes o abuso de álcool (cirrose alcoólica) e infecções virais (particularmente a Hepatite C). Ainda, cerca de 17% dos casos de hepatite aguda são

criptogênicas, isto é, de causa desconhecida (Codes, 2006), sendo sugeridos como possíveis causas infecções virais desconhecidas (Paraná, 2003), doenças metabólicas ou hepatite auto-imune de apresentação atípica (Czaja, 1993).

A hepatite alcoólica é apontada como a principal motivação para o desenvolvimento de cirrose, e principal motivo de internação entre as doenças hepáticas conhecidas (Jinjuvadia, 2015). O consumo de álcool, quando realizado diariamente e por um longo período de tempo, é capaz de produzir o quadro cirrótico no indivíduo, podendo chegar a extremos, como a necessidade de transplante de fígado ou até ao óbito. Estima-se que o consumo diário de mais de 60 gramas de etanol por indivíduos do sexo masculino e 20 gramas por indivíduos do sexo feminino e por um período de mais de 10 anos podem levar os indivíduos ao quadro cirrótico apontado anteriormente (Silva, 2010). No mundo, doenças hepáticas relacionadas ao abuso do álcool são a maior causa de morbidade e mortalidade dentre as doenças hepáticas (Liang, 2011; Liangpunsakul, 2011; Sandahl, 2011).

As hepatites virais são outra grande causa das cirroses hepáticas diagnosticadas, sendo a Hepatite B e a Hepatite C crônicas as mais importantes para o desenvolvimento do quadro clínico de cirrose. A Hepatite B é causada por um vírus (HBV) da família *Hepadnavirus*, e seu material genético é uma dupla fita de DNA (Ohno, 2015). A hepatite B é considerada uma doença sexualmente transmissível (DST) e sua transmissão pode ocorrer tanto através de ato sexual não protegido quanto pelo contato com material biológico proveniente de indivíduos infectados. Possui vacina disponível e distribuída gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que existem atualmente 240 milhões de pessoas infectadas cronicamente pelo HBV, sendo que é estimado o número de 780 mil óbitos por ano em decorrência de complicações desta infecção, incluindo-se cirrose e câncer de fígado.

A Hepatite C também é uma doença infecciosa, sendo causada pelo vírus da hepatite C (HCV). Sua transmissão é atribuída principalmente ao compartilhamento de agulhas e a transfusões sanguíneas, sendo também indicado por Maheshwari

(2010) como um dos motivos de transmissão as práticas clínicas pouco seguras. A Organização Mundial da Saúde estima que a prevalência mundial de pessoas infectadas com o HCV atualmente é de 170 milhões de pessoas. O HCV é um vírus de RNA de fita simples, pertencente à família *Flaviviridae* (Maheshwari, 2008) e para o qual não existe vacina efetiva contra.

A hepatite autoimune é caracterizada pela presença de autoanticorpos que causam inflamação do fígado, dentre outros efeitos. O fator inicial da doença é ainda desconhecido, entretanto, os seus desdobramentos incluem efeitos extremos, como a cirrose e o óbito do indivíduo (Czaja, 2015). Algumas doenças de etiologia ainda não totalmente elucidada, mas que apontam um papel do sistema imune são a Colangite Esclerosante (Bowlus, 2014) e a Cirrose Biliar Primária (Carey, 2015).

2.3 Dano Sistêmico Relacionado ao Quadro Cirrótico

Como visto, o quadro cirrótico grave possui um longo período de tempo necessário para se estabelecer, com a gradativa danificação da estrutura celular hepática ao longo de, em média, mais de dez anos. Esta fase da doença, chamada de fase crônica, é acompanhada não só dos danos diretos ao órgão, mas também de um cenário de desequilíbrio e da presença de componentes danosos que afetam todo o sistema orgânico do indivíduo. E grande parte dos problemas apresentados estão relacionados à inflamação sistêmica que desenvolve-se no indivíduo hepático (Dirchwolf, 2015; Clària *et al.*, 2016).

De acordo com a evolução da doença, outros problemas sistêmicos começam a aparecer. Um dos problemas apresentados é a diminuição da contratilidade do miocárdio, além de anormalidades eletrofisiológicas detectadas no coração de indivíduos cirróticos (Moller; Henriksen, 2008; Baik; Fouad; Lee, 2007). Estes problemas tornam-se grandes preocupações para os indivíduos que se submetem ao transplante de fígado, pois complicações podem surgir mediadas por estes problemas,

inclusive este sendo motivo de óbito para vários indivíduos que realizam o transplante de fígado (Møller, 2012).

2.4 Sangue

O sangue é um tecido conjuntivo que tem por função transportar nutrientes para todo o nosso organismo, bem como coletar o material a ser excretado e levá-lo ao órgão de destino (Hamasaki; Yamamoto, 2000). Ele é líquido, de cor vermelha e, em sua composição, possui uma parte celular, onde estão presentes diversos tipos celulares, como os eritrócitos, os neutrófilos, basófilos, eosinófilos, linfócitos e basófilos. Ainda, possui fragmentos celulares que tem por função atuar na cadeia de coagulação frente a um estímulo, as plaquetas (Basu, Kulkkarni, 2014).

Como um efeito da cirrose, há o aparecimento de um dano sistêmico, que pode ser observado através da análise dos componentes e do *status* do sangue periférico, sangue este que foi utilizado neste estudo para as análises de estresse oxidativo e dano ao DNA.

2.5 Estresse Oxidativo

A produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Nitrogênio (ERNs) é um processo natural nos seres vivos, e tem grande importância biológica, visto que estas espécies reativas são utilizadas durante a defesa do organismo frente a um patógeno invasor. Porém, a produção excessiva destas espécies pode desencadear diversos problemas biológicos, uma vez que estas espécies reagem com as mais diversas moléculas biológicas celulares, e são capazes de provocar danos a proteínas, lipídios e ao material genético, podendo levar ao desenvolvimento de câncer. Por isso, o nosso organismo dispõe de uma vasta e eficiente cadeia de enzimas e moléculas antioxidantes, que visam prevenir os efeitos danosos da produção das EROs e ERNs. Na frente de defesa enzimática

podemos destacar a Catalase, a Superóxido Dismutase e a Glutathione Peroxidase, enquanto que na frente não-enzimática destacamos a Glutathione Reduzida, os Carotenóides, o Ácido Úrico entre outros (Halliwell e Gutteridge, 2006). O cenário em que há um desequilíbrio entre as moléculas pró e antioxidantes, com uma predominância das primeiras e em decorrência disto a produção de danos celulares, é chamado estresse oxidativo (Sies, 1985; Vasconcelos *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2010).

Espécies Reativas de Oxigênio são moléculas, geralmente derivadas do O_2 , que possuem um elétron desemparelhado na sua última camada de valência, tornando essas moléculas altamente reativas, pois o número ímpar de elétrons na última camada de valência torna a molécula altamente instável. Entre as EROs conhecidas, podemos citar o Radical Superóxido (\dot{O}_2^-), que por uma reação de redução recebeu um elétron; o radical Hidroperoxila (HO_2^\cdot), que é a forma protonada do radical Superóxido e é mais reativo do que o mesmo; e o radical Hidroxila (\dot{OH}), que é o mais reativo radical conhecido e altamente danoso à estrutura e maquinaria celular, pois não possuímos nenhuma maquinaria ou estrutura de defesa contra este radical (Ferreira *et al.*, 1997).

O perfeito controle dos níveis de atividade das enzimas antioxidantes nas células é essencial para a sobrevivência do indivíduo. Destacam-se três enzimas que atuam no controle dos níveis de EROs: A superóxido dismutase (SOD), a catalase (Cat) e a glutathione peroxidase (GPx). Inicialmente, a SOD neutraliza um Radical Ânion Superóxido dismutando-o em Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2). Porém, o peróxido de hidrogênio é capaz de reagir com metais de transição e formar o radical hidroxila (\dot{OH}), que é o radical mais reativo produzido e que ataca as mais diversas moléculas celulares (DNA, RNA, proteínas, lipídios), podendo em um longo período de tempo causar o aparecimento de câncer e outras desordens à saúde (Barreiros *et al.*, 2006). Deste modo, as duas outras enzimas da cadeia – catalase e glutathione peroxidase -, de forma independente entre si, catalisam a transformação do Peróxido de Hidrogênio em Água e Oxigênio Molecular (Gaetani *et al.*, 1989). Neste trabalho foi avaliada a atividade de uma enzima que faz parte da cadeia

antioxidante: a enzima Catalase, que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio.

Galicia-Moreno e Gutiérrez-Reyes (2014) em seu trabalho demonstraram que há uma possível relação entre a produção de radicais livres e o desenvolvimento de doença hepática relacionada ao abuso de álcool. Doenças autoimunes que levam a um quadro cirrótico também estão relacionadas com um quadro de estresse oxidativo (Kaffe *et al.*, 2014), assim como quadros de hepatite viral (Schinzari *et al.*, 2015). Estudos *in vivo* também indicam que o Estresse Oxidativo contribui para a ocorrência ou o agravamento da fibrose presente no fígado durante o processo cirrótico (Marcus *et al.*, 2012).

2.6 Dano ao DNA

Danos ao DNA são ocorrências naturais nos organismos vivos, e podem ter efeitos danosos aos organismos caso não sejam reparados. Um dano ao material genético da célula é capaz de provocar desde a parada do ciclo celular até a morte celular por apoptose. Em casos mais severos, genes supressores de tumores podem ser danificados, propiciando o aparecimento de mutações genômicas e câncer. Por estes motivos, toda uma maquinaria intracelular existe a fim de corrigir os eventuais erros e danos que ocorram no DNA (Tian, 2015; Wang, 2015). Um dano pode ter uma dentre diversas causas, sendo as mais comuns a administração de fármacos, a radiação ultravioleta, as radiações ionizantes, a produção endógena de radicais livres, componentes tóxicos ambientais, entre outros, que podem provocar instabilidade genômica e maior susceptibilidade à quebras do material genético (Roos, 2015; Marullo, 2015).

Há uma relação entre instabilidade genética e o desenvolvimento de câncer, sendo que podemos dividir as alterações genéticas em quatro categorias: Pequenas alterações de sequência causadas por substituições de bases ou inserções e eliminações de alguns nucleotídeos (1); Amplificações gênicas (2); Perdas ou ganhos de cromossomos inteiros (3) e Aberrações cromossômicas (4), havendo o estresse oxidativo um papel

fundamental principalmente nas alterações de tipo 1 (Burma *et al.*, 2006; Perri, Pisconti e Scarpati, 2016).

Os danos mais comuns presentes no DNA são quebras de fita simples, quando apenas uma das fitas da dupla hélice de DNA é danificada, e quebras de fita dupla, quando as duas fitas da dupla hélice são danificadas, sendo que cada dano tem um mecanismo de reparo diferente.

Para as quebras de fita simples, o mecanismo de reparo é a excisão da(s) base(s) danificada(s) e a utilização da fita complementar não danificada como molde por parte de uma enzima DNA polimerase, que repara o local do dano original. Este é um dano relativamente simples de ser resolvido, normalmente não ocasionando maiores danos à célula ou ao indivíduo (Nakabeppu, 2014).

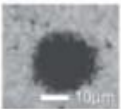
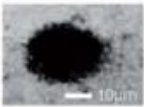
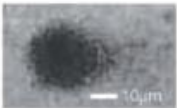
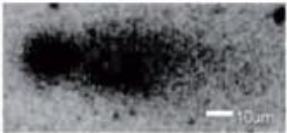

Já as quebras de fita dupla são mais prejudiciais, pois neste dano ambas as fitas da dupla hélice são quebradas, e o mecanismo de reparo pode ocorrer de duas maneiras: A primeira (e mais rara) é a utilização de uma cromátide-irmã como molde para a correta recomposição das fitas de DNA danificadas. Porém, este mecanismo apenas está disponível nas fases do ciclo celular em que há uma cromátide-irmã disponível, o que acontece durante a divisão celular. Na maior parte do ciclo estas cromátides-irmãs não encontram-se disponíveis, de modo que o mecanismo de reparo para as quebras de fita dupla seja a retirada da porção de DNA que encontra-se danificada e a simples reconexão das fitas. Este é um mecanismo perigoso, pois modificações permanentes ao DNA são incorporadas, e caso estas modificações ocorram em sítios relacionados à carcinogênese (como genes supressores de tumor), pode levar ao desenvolvimento de câncer (Burma, 2006; Kozak, 2009).

Assim, dois testes são amplamente utilizados para a detecção de danos ao DNA. O ensaio cometa, que é capaz de detectar as quebras de fita simples e quebras de fita dupla (e, portanto, danos reparáveis) e a técnica do micronúcleo com bloqueio da citocinese, que avalia danos ao DNA já consolidados.

O ensaio cometa é bastante versátil, sendo capaz de detectar danos relacionados a lesões genômicas decorrentes de quebras de fita simples, quebras de fita dupla, eventos de reparo

por excisão de bases incompletas, *crosslinks* DNA-DNA, *crosslinks* DNA-proteínas, e formação de sítios álcali-lábeis (SINGH et al, 1988). Nesta técnica, o DNA migra por um gel de agarose durante uma corrida eletroforética, levando à observação dos danos descritos pela formação de uma “cauda” em cada célula danificada, sendo que cada célula observada recebe uma pontuação que vai de 0 (sem dano aparente) a 4 (dano máximo), escala que pode ser observada na figura 1.

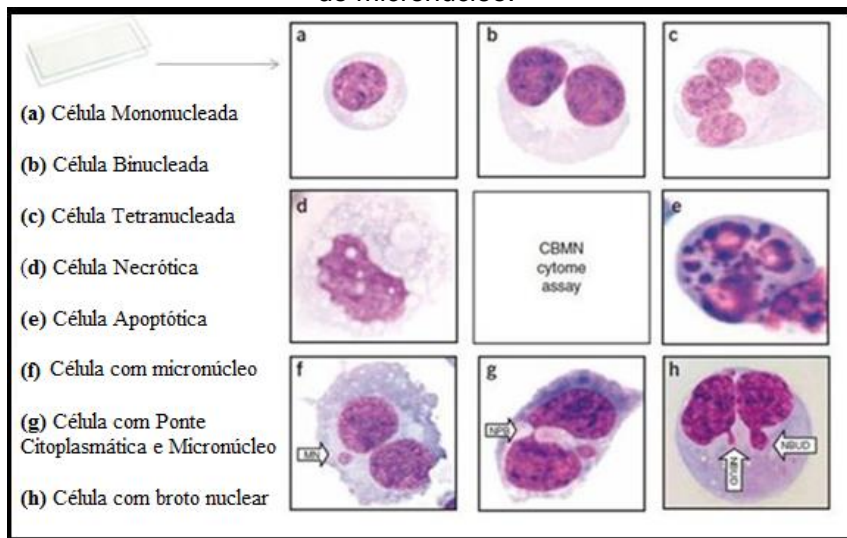
Figura 1: Tabela de danos do ensaio cometa.

Imagem Observada	Classes de Danos
	0
	1
	2
	3
	4

Fonte: Adaptado de Villela *et al.*, 2006

A técnica de micronúcleo com o bloqueio da citocinese em cultura de linfócitos do sangue periférico tem a capacidade de detectar alguns tipos de danos ao DNA consolidados, isto é, após a ação de mecanismos de reparo do material genético. A técnica foi descrita por Fenech e Morley (1985) e através dela é possível observar quebras cromossômicas ou perdas de cromossomos inteiros, através da formação de micronúcleos, ampliações gênicas detectadas através da expressão de brotos nucleares e até divisões celulares ocorridas de forma errônea, com cromossomos ficando ligados aos dois núcleos após a divisão nuclear, sendo visível através da presença de pontes nucleoplasmáticas. Estas principais expressões de mutagenicidade têm as suas observações exemplificadas na Figura 2, abaixo.

Figura 2: Principais observações de dano detectados pela técnica do micronúcleo.



Fonte: Adaptado de Fenech *et al.*, 2007.

Tanto os danos observados através do ensaio cometa quanto os observados através da técnica do micronúcleo são

comuns de acontecerem no nosso organismo, e normalmente não incidem em maiores problemas para o indivíduo. Porém, alguns agentes externos ou internos podem aumentar drasticamente o aparecimento destes danos. A produção endógena de radicais livres é um grande fator interno relacionado a estes danos, enquanto que como fatores externos podemos citar a presença de componentes xenobióticos no ambiente (Bolognesi *et al.*, 2011; George e Shukla, 2011; Qi *et al.*, 2012; Shawki *et al.*, 2014).

2.7 Resposta Imune do Fígado e Inflamação

O Processo Inflamatório é um processo orgânico que tem seu início causado por uma infecção e/ou por uma lesão tecidual. Este processo é mediado pelo sistema imune inato do indivíduo, no qual leucócitos e macrófagos, ao receberem um estímulo, liberam citocinas e quimiocinas que estimulam e ativam mais ainda o sistema imune do indivíduo, levando a uma migração de células de defesa para o local afetado e aumentam a irrigação sanguínea local, levando aos cinco sinais clássicos da inflamação, a saber: Calor, Rubor, Edema, Dor e, em último estágio, Perda de Função (Freire; Van Dyke, 2013).

O fígado é um órgão diferenciado no que diz respeito ao sistema de defesa que se encontra ali alocado. Por causa de sua natureza fisiológica, este possui células de defesa específicas, as já mencionadas *Pit Cells*, que são residentes do órgão. Mas também estão presentes outros linfócitos, macrófagos e células de defesa que encontram-se circulantes a todo o organismo. A infecção crônica pelos vírus da Hepatite B e/ou Hepatite C (HBV e HCV) têm a capacidade de ativar este sistema de defesa, levando o órgão à um processo inflamatório crônico (Debes; Knegt; Boonstra, 2016; Younas *et al.*, 2017), bem como este processo pode ser ativado através da ingestão exagerada de álcool de forma crônica pelo indivíduo (Wang *et al.*, 2012; Gao; Battaller, 2011).

A inflamação crônica é um cenário em que há a constante ativação de células do sistema de defesa do indivíduo e que, como consequência, há a produção e liberação contínua

de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias por parte destas células, levando o processo a uma retroalimentação constante, e potencializando os seus efeitos a longo prazo. Um destes efeitos é o cenário de Estresse Oxidativo. A relação entre a produção de radicais livres e o cenário inflamatório já é muito bem descrito na literatura, não sendo exclusiva do quadro cirrótico que é foco deste trabalho (Kiasalari *et al*, 2017; Pena *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2016).

2.8 Relação entre Estresse Oxidativo e Dano ao DNA

O Estresse Oxidativo é caracterizado como o desbalanço entre a produção de Radicais Livres e a sua neutralização pelo sistema de defesa antioxidante presente no organismo, havendo um excesso na produção de Radicais Livres ou uma diminuição na eficiência do sistema de defesa antioxidante do organismo, levando muitas vezes a um dano celular ocasionado pelo ataque destas moléculas a componentes celulares, como proteínas, lipídios e inclusive ácidos nucleicos (Sies e Jones, 2007).

Estudos já observaram haver uma associação entre o cenário de Estresse Oxidativo e o aumento dos índices de quebra de DNA em pesquisas realizadas em camundongos (Li *et al.*; 2016), em ratos (Ganai *et al.*, 2016; Silveira *et al.*, 2015) e em humanos (Qi *et al.*, 2012; Shawki *et al.*, 2014). Estes resultados observados são bastante plausíveis, pois as moléculas possuidoras de radicais livres não são seletivas ao participarem de uma reação que as deixe estáveis novamente, sendo utilizadas para esse fim de estabilização moléculas que acabam perdendo a sua função no metabolismo e na composição celular, e isto inclui o DNA presente no núcleo celular.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar alguns parâmetros indicativos de estresse oxidativo e marcadores de dano de DNA no sangue de pacientes atendidos em crise cirrótica na Emergência do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU-UFSC).

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho foram os seguintes:

- Analisar a atividade de uma enzima pertencente à cadeia antioxidante celular (Catalase – Cat) a partir do sangue periférico de pacientes em crise cirrótica;
- Determinar a Peroxidação Lipídica Sistêmica através da técnica TBARS, a partir do plasma de pacientes em crise cirrótica;
- Analisar os índices de quebras de fita simples, quebras de fita dupla e de alterações estruturais sensíveis ao pH alcalino, das fitas de DNA, através da técnica cometa em leucócitos do sangue periférico de pacientes em crise cirrótica;
- Analisar a frequência de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas, brotos nucleares e o índice mitótico em linfócitos binucleados, através da técnica do Micronúcleo realizada a partir do sangue periférico de pacientes em crise cirrótica;

4 SUJEITOS E MÉTODOS

Foram utilizadas nesta pesquisa amostras de sangue periférico de pacientes em crise cirrótica que deram entrada na Unidade de Emergência do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU-UFSC).

O número de indivíduos cooptados para este estudo foi de 62 pacientes. O grupo controle foi constituído por 35 indivíduos saudáveis, escolhidos para que a média de idade, a distribuição de gênero e a proporção de fumantes fossem similares às características do grupo teste. Estes foram cooptados na unidade de doação de sangue do HU-UFSC, em Florianópolis, e entre indivíduos que se encaixavam no perfil desejado no município de Antônio Carlos/SC.

Ao dar entrada no HU-UFSC, os indivíduos em crise cirrótica são imediatamente internados, e uma série de exames é solicitada pelo médico de plantão no local. Entre estes exames, está o exame de Ngal/Cistatina, que é exclusivo para estes pacientes. Desta forma, diariamente no período matutino, a fim de buscar pacientes que poderiam fazer parte deste estudo, foram realizados relatórios a partir do sistema informatizado de exames do HU-UFSC em busca de pacientes que tiveram solicitados os exames previamente citados. Quando estes exames eram solicitados em pacientes que se encontravam no quadro buscado para esta pesquisa, o paciente era incluído na amostra. Após concordância e assinatura do Termo de Consentimento pelo paciente, as amostras em questão foram recolhidas através de punção venosa a fim de extrair sangue periférico do indivíduo. Foram utilizados dois tubos para a coleta, sendo um tubo com Heparina e um tubo com EDTA. Em cada tubo foram coletados aproximadamente 4 ml de sangue periférico. Após a coleta, os tubos foram encaminhados ao laboratório, local em que foram processados conforme descrito a seguir.

Os tubos com EDTA foram processados a fim de o material resultante ser utilizado para as análises de estresse oxidativo. Para cada paciente, o material foi separado em dois tubos criogênicos, cada um utilizado para a sua devida análise. Inicialmente, misturou-se em um tubo criogênico 2 ml de água

destilada com 0,5 ml de sangue total a fim de obter-se o hemolisado, pois este lisado contém a enzima que teve a sua atividade analisada no estudo, sendo ela a Catalase. Os lisados foram armazenados em um freezer na temperatura de -80°C , a fim de que as enzimas ficassem preservadas até o momento da sua análise. Por fim, o sangue restante no tubo com EDTA foi centrifugado por 7 minutos a 4500 g, a fim de que o plasma do sangue fosse separado dos outros componentes. Este plasma foi acondicionado em um segundo tubo criogênico, e este também foi armazenado no freezer em uma temperatura de -80°C , pois posteriormente este material foi utilizado para a análise de TBARs. O restante do material do tubo com EDTA foi descartado em local apropriado.

Em um segundo momento, mas no mesmo dia da coleta, o sangue contido no tubo heparinizado era processado de acordo com o que será descrito a seguir nas técnicas de Micronúcleo e de Cometa.

4.1 Ensaio cometa

O ensaio Cometa realizado é um teste capaz de detectar quebras de fita simples e quebras de fitas duplas, sítios alcálilábeis e crosslinks. Este método permite a observação dos níveis de danos ao material genético celular, através da migração do DNA em um gel de agarose em uma corrida eletroforética. Ele foi descrito inicialmente por Singh *et al.* (1988) e foi adaptado para ensaios *in vivo* por Tice *et al.* (2000), adaptação esta que foi utilizada neste trabalho.

A técnica se inicia antes mesmo da chegada do material. Alguns dias antes era aplicado na superfície de algumas lâminas de microscopia gel de agarose normal 7%, sendo estas lâminas colocadas em estufa para secar por 3 dias. Esta é chamada de pré-cobertura de agarose, e tem a importância de posteriormente impedir que o gel de agarose de baixo ponto de fusão que será aplicado caia da lâmina nas etapas subsequentes da técnica.

No dia da chegada do material, em uma capela de fluxo de ar previamente esterilizada através da exposição à radiação UV por 15 minutos, alíquotava-se aproximadamente 100 μl de

sangue total em um microtubo. Deste microtubo, retirava-se 5 µl de sangue e misturava-se a 95 µl de agarose com baixo ponto de fusão (0,07%) em um segundo microtubo. Depois, esta mistura era pipetada na lâmina previamente preparada com uma cobertura de agarose, e esta é coberta com uma lamínula, sendo levada à geladeira por 10 minutos, até a agarose solidificar. Após a solidificação da agarose *low melting*, retirava-se a lamínula de forma cuidadosa e de modo a não danificar a agarose e colocava-se a lâmina em uma solução de lise previamente preparada, sendo então esta armazenada em geladeira por 1-15 dias. Após este tempo, as lâminas eram retiradas da solução, colocadas em cuba de eletroforese e imersas em uma solução alcalina durante 20 minutos, tempo necessário para ocorrer o desenovelamento das fitas de DNA e consequente exposição dos sítios alcali-lábeis e das quebras de fita única e dupla fita. As amostras então eram submetidas à eletroforese (25 V; 300 mA; 0.9 V/cm) durante 25 minutos. Após este tempo, eram feitas 3 lavagens em solução neutralizadora e 3 lavagens em água destilada, sendo as lâminas acondicionadas em estufa a 37°C por 2 horas. Todos os processos citados anteriormente, da chegada do material até o término da eletroforese, eram realizados sem exposição das células à luz branca, pois esta pode causar um aumento na quantidade de lesões na estrutura do DNA (Singh *et al.*, 2002). Por fim, as lâminas são fixadas em solução fixadora e coradas com coloração de prata, como demonstrado em Nadin *et al.* (2001).

Foram analisadas 100 células por indivíduo, tendo cada célula recebido uma avaliação de dano variando de 0 a 4, dependendo do tamanho da “cauda” encontrada, levando a um valor final por indivíduo de 0 a 400. Quanto maior este valor, há a indicação de um maior índice de dano ao DNA do indivíduo. A análise foi realizada em um microscópio de luz e em um aumento de 200 vezes.

4.2 Técnica de micronúcleos com o bloqueio da citocinese celular

A técnica do Micronúcleo avalia o dano ao DNA já estabelecido após a ação do sistema de reparo, por isso é considerada uma avaliação da mutagenicidade, enquanto a técnica do cometa avalia a genotoxicidade (dano de DNA que ainda pode ser reparado). A técnica foi descrita por Fenech e Morley, em 1985 e avalia quebras cromossômicas, perdas de cromossomos inteiros, ampliações gênicas expressadas através dos brotos nucleares.

Após a chegada do material coletado, o tubo heparinizado foi utilizado para a separação de uma alíquota, como descrito na técnica do cometa. Esta separação do material visa garantir a não contaminação da amostra por agentes externos ao paciente, pois para esta técnica é necessária a realização de cultura celular. O sangue não contaminado inicialmente foi misturado 0,5 ml com 4 ml de meio RPMI, 1 ml de Soro Bovino Fetal e 0,1 ml de Fitoemaglutinina, tudo isso em um tubo cônico de plástico. Após isto, colocava-se em estufa de cultura a 37°C por 72h. Após 44h do início da cultura, adicionava-se 0,125 ml de Citocalasina B e devolvia-se a cultura para a estufa, até completar as 72h. Após esse período, a cultura era retirada da estufa e centrifugada por 7 minutos a 4500 g. O sobrenadante era descartado e o pellet era ressuspendido em 5 ml de uma solução hipotônica de KCl por 7 minutos. Ao fim deste tempo, era adicionado 0,5 ml de solução fixadora e o tubo era novamente centrifugado por 7 minutos a 4500 g. O sobrenadante era retirado e eram realizadas duas lavagens do pellet com solução fixadora. Por fim, era adicionado 5 ml de solução fixadora e o tubo ficava em geladeira por no mínimo 24 horas. Após este período, pingava-se duas gotas de material em uma lâmina de microscopia limpa e esperava-se secar. Então, a lâmina recebia uma solução de 20% de corante GIEMSA durante 3 minutos. A análise foi feita contando o número de eventos que ocorrem em cada paciente após a análise de 1000 linfócitos binucleados em microscópio óptico em um aumento de 200 vezes, sendo os eventos confirmados em aumento de 1000 vezes.

Ainda, foi realizado o cálculo para se determinar o Índice Mitótico, como descrito por Fenech (2007). Para isto, foram contabilizadas por paciente 500 células, sendo discriminados os

números de células encontradas com apenas um núcleo, células com dois núcleos, três núcleos e quatro núcleos. Ao fim da contagem de 500 células, foi realizado o cálculo descrito a seguir: $IM = [N \text{ Mono} + (2 * N \text{ Bi}) + (3 * N \text{ Tri}) + (4 * N \text{ Tetra})] / 500$. De forma extensa, podemos descrever o cálculo como sendo o Número de células Mononucleadas mais Duas vezes o número de células Binucleadas mais Três vezes o número de células Trinucleadas mais Quatro vezes o número de células Tetranucleadas, tudo isso dividido por 500.

4.3 TBARS

Para esta análise, foi utilizado o método descrito por Bird e Draper. (1984). A peroxidação lipídica do tecido permite o aparecimento de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico, formando uma coloração rosa e que é mensurada por meio espectrofotométrico.

Inicialmente, misturou-se 1 ml de Ácido Tricloroacético (TCA) e 100 µl de plasma e agitou-se em um agitador de tubos. Depois, adicionou-se 900 µl de tampão TRIS-HCl 60 mM, pH 7,4, 1 ml de Ácido Tiobarbitúrico (TBA – 0,73%) e agitou-se novamente o tubo em um vortex. Depois, os tubos foram fervidos a 100°C em banho-maria durante uma hora. Nesta etapa ocorre a reação entre o TBA e os produtos da lipoperoxidação, formando uma base de Schiff de coloração rosa (Bird & Draper, 1984). Para o preparo do “branco”, que foi usado para descontar a absorbância normal dos reagentes, utiliza-se os mesmos volumes acima mencionados, mas ao invés de amostra utiliza-se água destilada, além deste não ser fervido.

Após a fervura das amostras centrifugou-se tudo a 4500 g durante 3 minutos e retirou-se 200 µl de sobrenadante, sendo este utilizado para a leitura espectrofotométrica em um comprimento de onda de 535 nm. Após o desconto do branco e o cálculo da concentração de substâncias, os valores foram expressos em $\eta\text{mol.mL}^{-1}$.

4.4 Catalase

A determinação da atividade da Catalase foi realizada conforme o método descrito por Aebi (1984). O método consiste na quantificação da velocidade do consumo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima presente na amostra em uma solução medida espectrofotometricamente durante 5 minutos a 240 nm. Para a realização do ensaio utilizou-se uma solução de peróxido de hidrogênio 10 mM em tampão fosfato 50 mM com pH 7,0. Em uma microplaca de 96 poços especial para a leitura em UV, adicionou-se 5 μL de amostra. Por fim, adicionou-se 200 μL de solução de peróxido de hidrogênio e imediatamente iniciou-se a leitura cinética. A leitura ocorre durante 5 minutos, e por fim o coeficiente de decaimento da curva é utilizado para calcular a atividade da enzima. O valor de atividade enzimática obtido foi expresso em $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

4.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados no programa SPSS 22.0. Para a análise de normalidade na distribuição dos dados entre os grupos foram realizados os testes de Shapiro-Wilk quando o número de indivíduos no grupo analisado foi menor do que 50 e o teste de Kolmogorov-Smirnov quando o número de indivíduos no grupo analisado foi maior do que 50. Para cada variável, foi realizado o teste U de Mann-Whitney ou o teste t de Student para verificar se há diferença estatística significativa entre a distribuição de valores entre os grupos ou se há diferença significativa entre as médias dos grupos, respectivamente. Ainda, no grupo de pacientes cirróticos, as diferentes variáveis foram utilizadas para verificar se há alguma correlação entre si, através da análise de Correlações de Spearman.

4.6 Aspectos Éticos

O presente trabalho faz parte de um grupo de pesquisa que tem como objetivo avaliar marcadores de prognósticos em

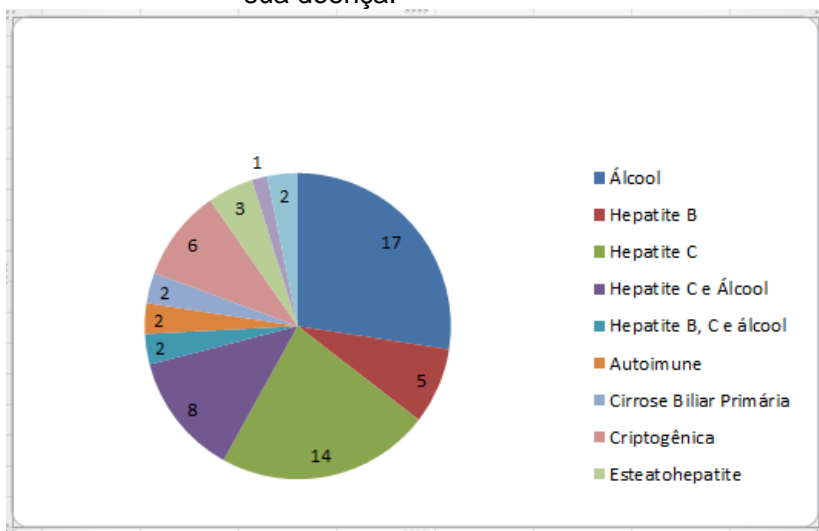
portadores de cirrose hepática. O grupo é coordenado pelo Prof. Dr. Leonardo de Lucca Schiavon, e está aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina sob o Certificado N° 1822 emitido em 28 de Fevereiro de 2011, como pode ser observado no Anexo I. Todos os participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) indicando que há autorização por parte dos mesmos para o uso do material coletado para fins de pesquisa científica.

5 RESULTADOS

5.1 Características Descritivas

Após a cooptação de pacientes ocorrida nos primeiros meses do ano de 2015 para o presente estudo, chegou-se ao número final de 62 pacientes incluídos no grupo pesquisado. Estes 62 indivíduos, que chegaram em crise cirrótica no HU-UFSC, chegaram a este cenário extremo motivados pelos mais diversos fatores, sendo possível determinar a etiologia que levou ao quadro cirrótico. Desta forma, chegamos ao resultado de 17 indivíduos exclusivamente causados pelo álcool, 5 indivíduos apenas com Hepatite B, 14 indivíduos apenas com Hepatite C, 8 indivíduos motivados pelo álcool e por Hepatite C, 2 indivíduos motivados pelo álcool, Hepatite B e Hepatite C, 2 indivíduos com Hepatite Autoimune, 2 indivíduos com Cirrose Biliar Primária, 6 indivíduos com Hepatite Criptogênica, 3 indivíduos com Esteatohepatite, 1 com Colangite Esclerosante e 2 indivíduos com esquistossomose. A distribuição acima mencionada pode ser observada na Figura 3.

Figura 3: Distribuição dos pacientes de acordo com a etiologia da sua doença.

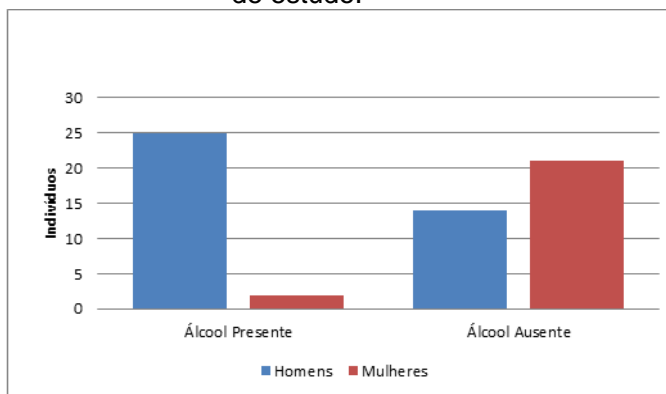


Fonte: O Autor.

Ao dividir os participantes do estudo por sexo, obtivemos a presença de 40 (64,52%) Homens e de 22 (35,48%) Mulheres.

Um dado interessante pode ser notado relativo ao sexo dos indivíduos participantes do estudo. Quando o álcool é ao menos uma das etiologias da cirrose dos participantes do estudo, há uma grande incidência de homens, enquanto que a incidência de mulheres é quase nula. Expressando de forma numérica, ao se considerar os indivíduos presentes nos 3 grupos que possuem álcool como ao menos uma das etiologias, chegamos ao número de 27 indivíduos. Destes, 25 (92,59%) são homens, enquanto apenas 2 (7,41%) são mulheres. Quando são consideradas todas as etiologias que não contém álcool como um dos componentes, chegamos aos números de 35 indivíduos, sendo 14 (40%) homens e 21 (60%) mulheres. A figura 4 demonstra estes resultados graficamente.

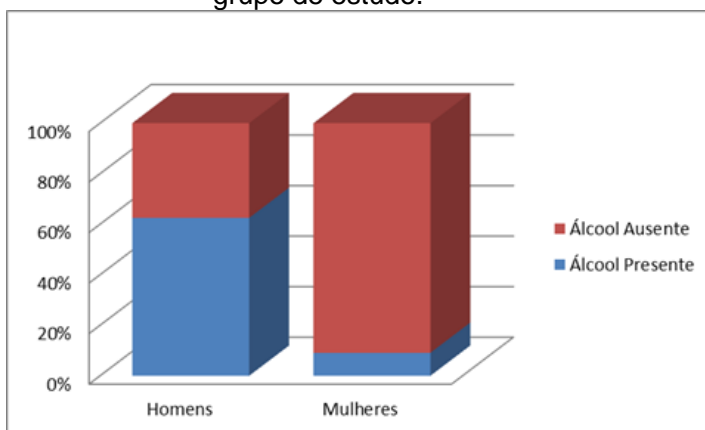
Figura 4: Relação entre o álcool e o sexo dos indivíduos do grupo de estudo.



Fonte: O Autor.

Analisando estes dados de outra forma, dos 40 homens presentes no estudo, 25 (62,5%) têm pelo menos uma das etiologias sendo a ingestão de Álcool, enquanto que ao analisar as 22 mulheres presentes no estudo, apenas 2 (9,1%) possuem pelo menos uma das etiologias a ingestão de Álcool. Estes dados são observados na Figura 5.

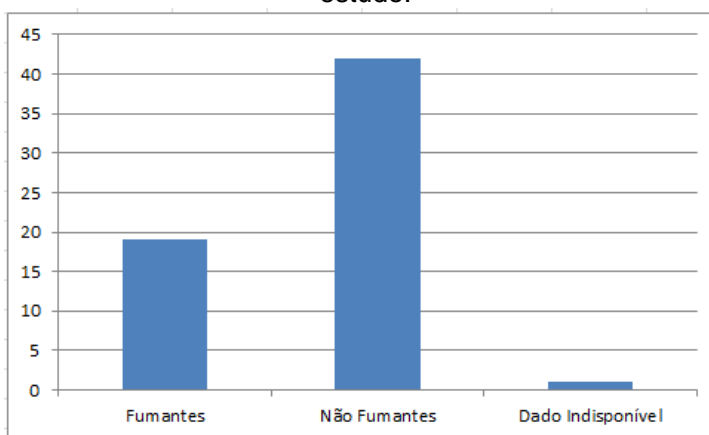
Figura 5: Distribuição da etiologia "álcool" dentre os sexos no grupo de estudo.



Fonte: O Autor.

Ao analisar-se os dados relativos ao tabagismo do grupo total em estudo, chegamos ao número de 19 (30,6%) atualmente fumantes, 13 (21%) indivíduos que já fumaram no decorrer da vida, mas neste momento não são mais fumantes, e 29 (46,8%) indivíduos que nunca fumaram. Um indivíduo (1,6%) não foi possível obter esta informação. Os dados se encontram graficamente expressos na Figura 6.

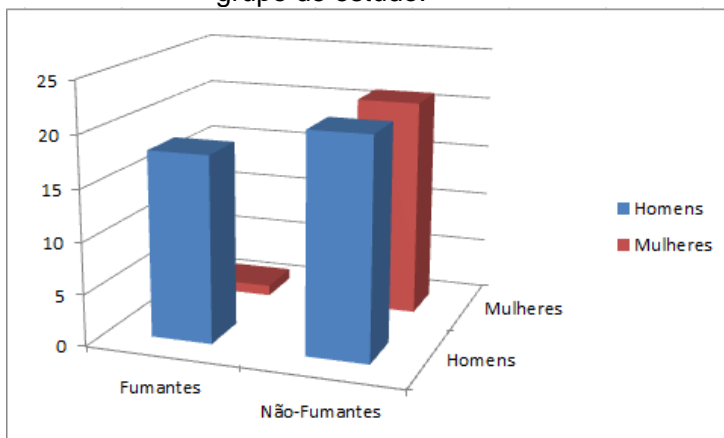
Figura 6: Números relacionados ao tabagismo no grupo de estudo.



Fonte: O Autor.

Ainda explorando os dados relativos ao tabagismo do grupo amostral, quando leva-se em consideração o sexo dos indivíduos, dos 19 indivíduos fumantes, 18 (94,74%) são homens, enquanto que apenas 1 (5,26%) é mulher. Dos ex-fumantes, dentre os 13 indivíduos, 9 (69,3%) são homens e 4 (30,7%) são mulheres. Entre os não fumantes, dos 29 indivíduos, 12 (41,48%) são homens e 17 (58,52%) são mulheres. O gráfico expressando estes dados pode ser observado na Figura 7.

Figura 7: Distribuição dos sexos em relação ao tabagismo no grupo de estudo.



Fonte: o Autor.

No que diz respeito às idades do grupo de pacientes cirróticos, a média do grupo ficou em 56,05 anos, com desvio padrão de 9,5. A mediana do grupo ficou em 57 anos, com o valor mínimo sendo 24 e o máximo 78.

Quando se faz a estatística descritiva do grupo controle, chegamos a um número de 35 indivíduos. A média de idade do grupo é de 52,11 anos, com desvio padrão de 13,28. A mediana de idade é 53, com o valor mínimo sendo 26 e o máximo 78. No quesito tabagismo, temos 5 fumantes e 30 não fumantes. Ainda, o grupo controle possui 17 homens e 18 mulheres.

Os valores mais relevantes dos parâmetros analisados podem ser observados abaixo, nas tabelas 1 e 2. Na tabela 1 podem ser observados os valores do grupo controle, e na tabela 2 estão descritos os valores do grupo de pacientes cirróticos.

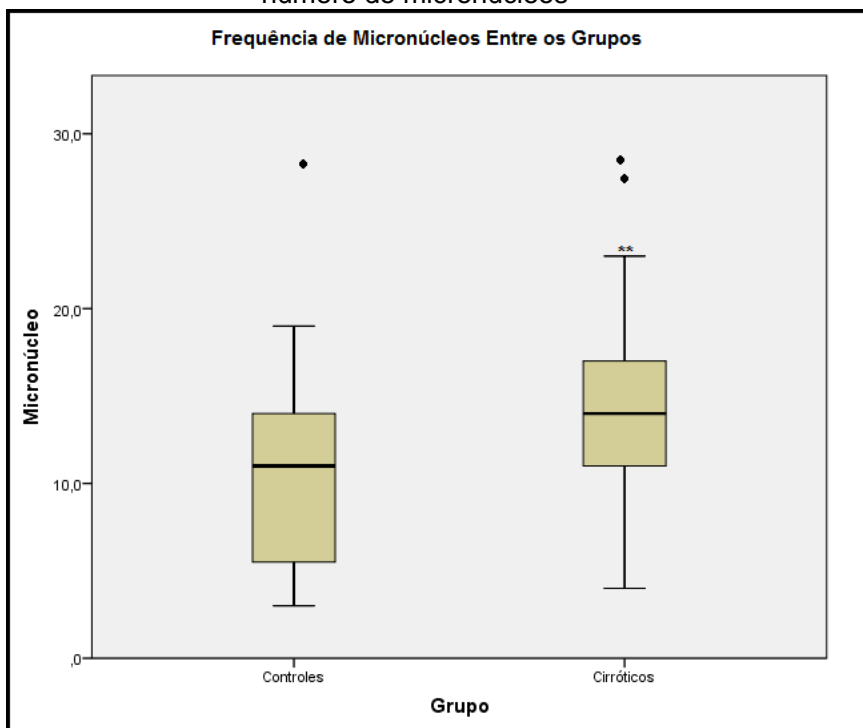
5.2 Estatística Indutiva

5.2.1 Micronúcleos, Pontes Nucleoplasmáticas e Brotos Nucleares

Após o processamento das amostras e da realização da Técnica de Micronúcleo, chegamos ao número de 49 indivíduos analisados no grupo de pacientes cirróticos e 35 indivíduos no grupo controle. Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk a fim de determinar se a distribuição dos dados nos grupos era normal. Com um $p < 0,05$ em ambos os grupos e para as três variáveis, chegou-se à conclusão que a distribuição dos dados não é normal para nenhuma das variáveis e em nenhum dos grupos. Desta forma, para determinar se há diferença estatística significativa entre a distribuição de valores em cada grupo e para cada variável, procedeu-se a realização do Teste U de Mann-Whitney.

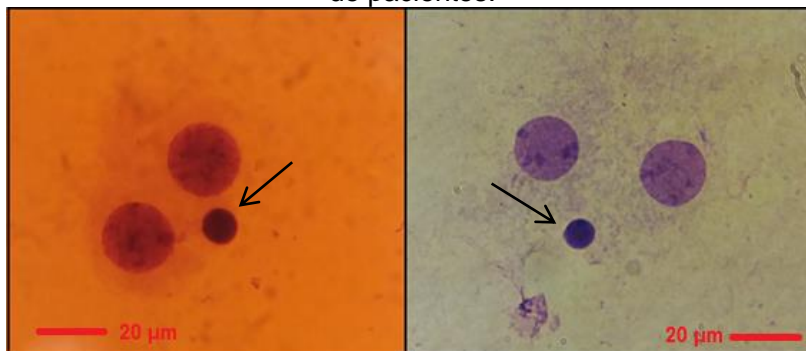
No que diz respeito ao número de micronúcleos, o grupo de pacientes apresentou valores de média de $14,75 \pm 5,47$ micronúcleos. Já no grupo controle, a média ficou em $10,54 \pm 5,68$ micronúcleos. Os dados não possuem distribuição normal, e o teste de hipótese utilizado foi o teste U de Mann-Whitney. O valor de p encontrado foi de $p < 0,01$, indicando que há diferença estatística significativa entre a distribuição de valores nos dois grupos, com os valores no grupo dos pacientes cirróticos sendo maiores do que os valores do grupo controle. O gráfico pode ser observado abaixo, na figura 8. Ainda, na figura 9, temos amostras fotográficas de alguns micronúcleos encontrados por mim durante a análise das lâminas.

Figura 8: Valores de mediana, quartis e limites da variável número de micronúcleos



. Os valores outliers são indicados por pontos. O p encontrado foi de $p < 0,01$ (**). Fonte: O Autor.

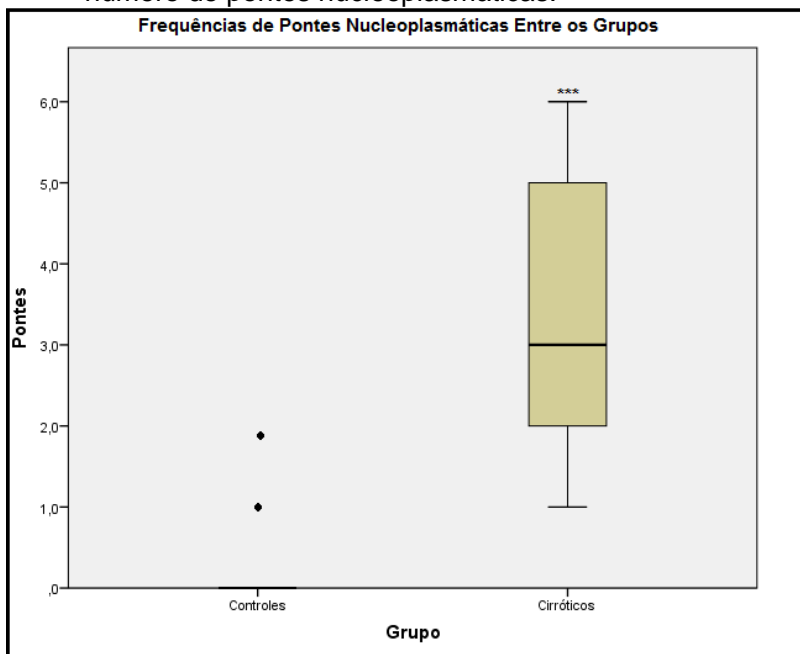
Figura 9: Imagens de micronúcleos (setas) encontrados no grupo de pacientes.



Fonte: O Autor.

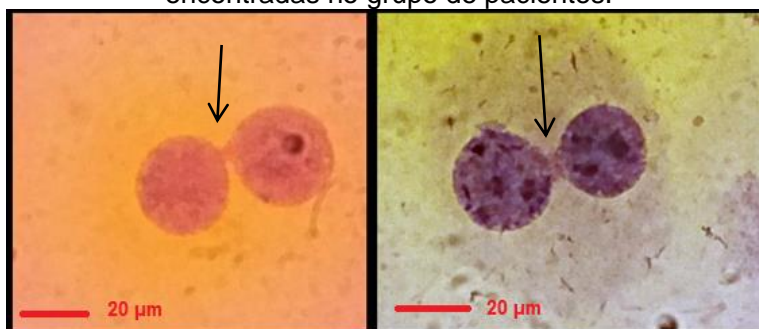
Para a variável número de pontes nucleoplasmáticas, encontramos no grupo de pacientes cirróticos uma média de $3,37 \pm 1,64$ pontes. Já no grupo controle, a média do número de pontes ficou em $0,314 \pm 0,631$. Os dados não possuem distribuição normal, e o teste de hipótese utilizado foi o teste U de Mann-Whitney. O valor de p encontrado foi de $p < 0,001$. O gráfico pode ser observado na figura 10, abaixo. Na figura 11, temos a documentação fotográfica de dois exemplos encontrados de pontes nucleoplasmáticas.

Figura 10: Valores de mediana, quartis e limites da variável número de pontes nucleoplasmáticas.



Os valores outliers são indicados por pontos. O p encontrado foi de $p < 0,001$ (***) . Fonte: O Autor.

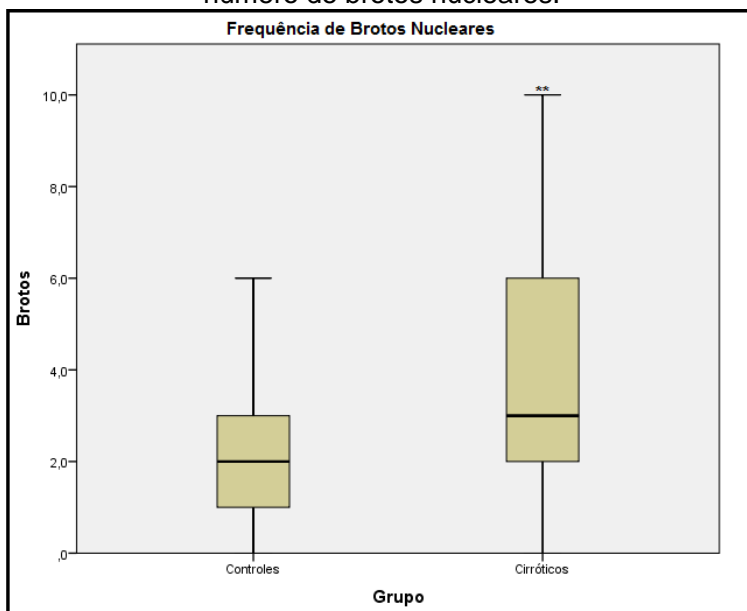
Figura 11: Imagens de pontes nucleoplasmáticas (setas) encontradas no grupo de pacientes.



Fonte: O Autor.

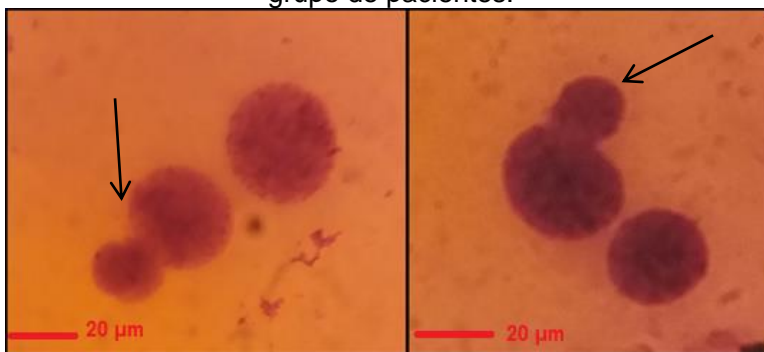
Ainda em relação ao teste do micronúcleo, obtivemos uma média de $3,98 \pm 2,5$ brotos nucleares no grupo de pacientes cirróticos. Já no grupo controle, a média encontrada foi de $2,31 \pm 1,57$. Os dados não possuem distribuição normal, e o teste de hipótese utilizado foi o teste U de Mann-Whitney. O p encontrado foi de $p < 0,01$. O gráfico pode ser observado abaixo, na figura 12. Na figura 13, temos a documentação fotográfica de dois exemplos encontrados de brotos nucleares.

Figura 12: Valores de mediana, quartis e limites da variável número de brotos nucleares.



O p encontrado foi de $p < 0,01$ (**). Fonte: O Autor.

Figura 13: Imagens de brotos nucleares (setas) encontrados no grupo de pacientes.



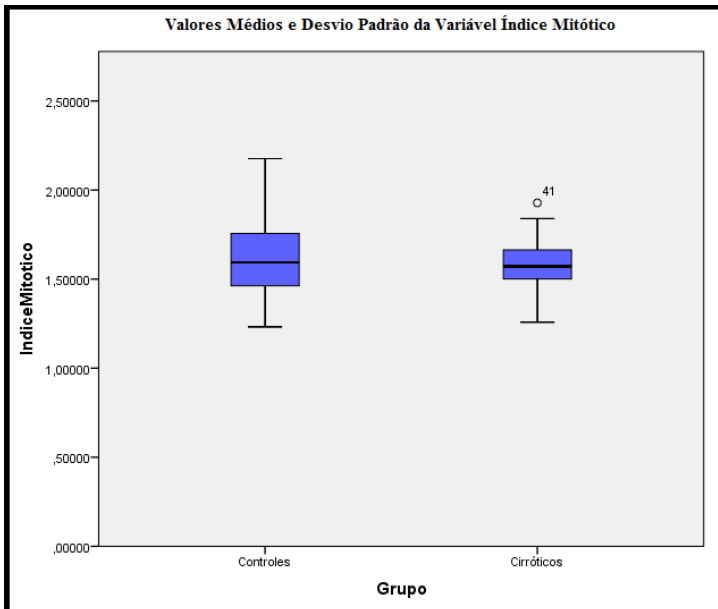
Fonte: O Autor.

5.2.2 Índice Mitótico

Para o cálculo do Índice Mitótico, foi utilizada a fórmula descrita na metodologia. Para constar, a fórmula é a seguinte: $IM = [N \text{ Mono} + (2 * N \text{ Bi}) + (3 * N \text{ Tri}) + (4 * N \text{ Tetra})] / 500$, onde IM é igual ao Índice Mitótico, N Mono é igual ao Número de Células Mononucleadas, N Bi é igual ao Número de Células Binucleadas, N Tri é igual ao Número de Células Trinucleadas e N Tetra é o Número de células Tetranucleadas.

No grupo de pacientes cirróticos, a média encontrada no valor do Índice Mitótico foi de $1,59 \pm 0,131$. Já no grupo controle, a média encontrada foi de $1,61 \pm 0,215$. Os dados possuem distribuição normal, e o teste de hipótese realizado foi o teste t de Student. Após a análise estatística, o p encontrado foi maior do que 0,05.

Figura 14: Gráfico de média e desvio padrão da variável Índice Mitótico.

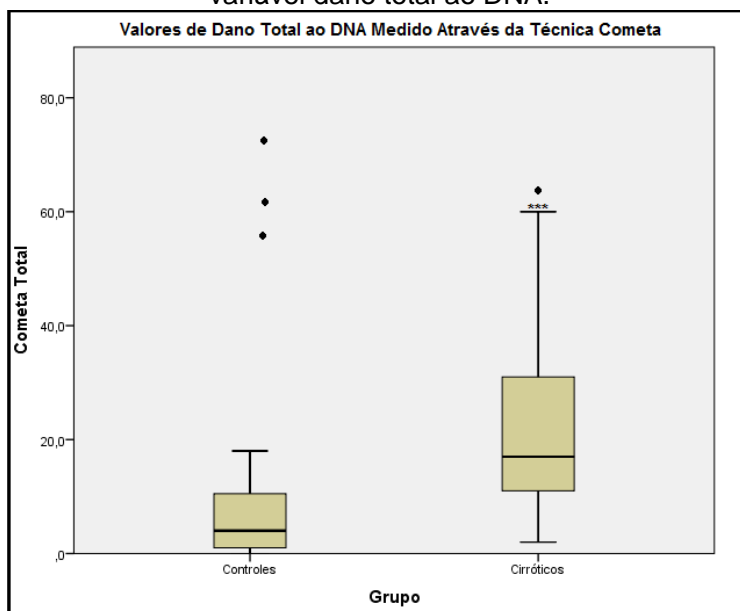


Valor de p encontrado foi de $p > 0,05$. Fonte: O Autor.

5.2.3 Teste Cometa

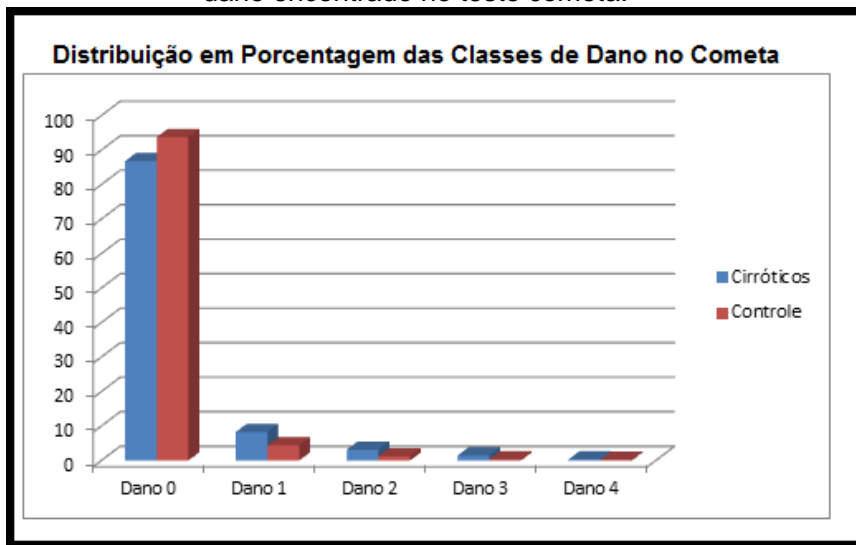
Após a análise dos resultados do Teste Cometa, chegamos ao número de 42 pacientes analisados do grupo de cirróticos. O grupo controle contou com 35 indivíduos. A média da pontuação de dano no grupo de pacientes cirróticos ficou em $21,17 \pm 14,93$. No grupo controle, a média de dano encontrada foi de $8,8 \pm 14,83$. Os dados não possuem distribuição normal, e o teste de hipótese utilizado foi o teste U de Mann-Whitney. O valor encontrado de p foi $p < 0,001$. O gráfico pode ser observado abaixo, na figura 15. Ainda, a figura 16 mostra a distribuição de porcentagens de cada classe de dano em cada grupo analisado.

Figura 15: Gráfico indicando a mediana, quartis e limites da variável dano total ao DNA.



Os valores outliers são indicados por pontos. O valor de p encontrado foi de $p < 0,001$ (***) . Fonte: O Autor.

Figura 16: Gráfico indicando as porcentagens de cada classe de dano encontrado no teste cometa.

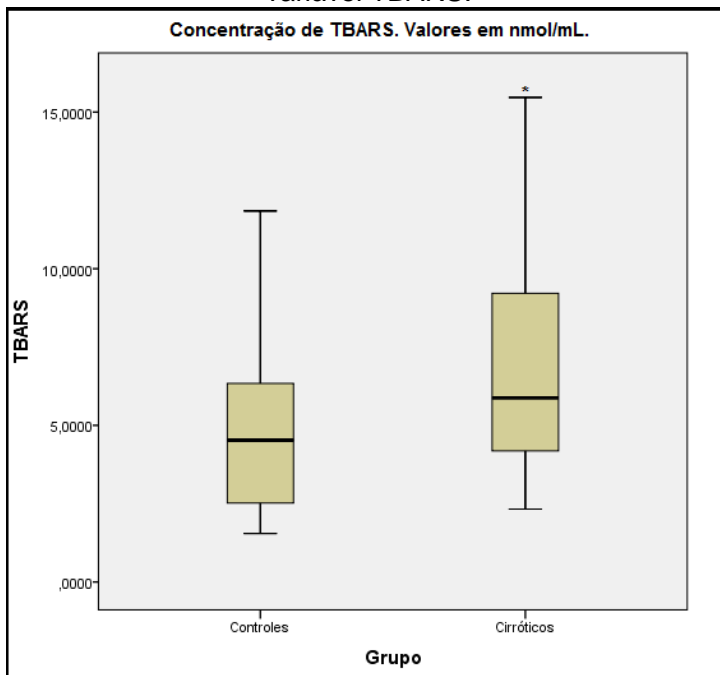


Fonte: O Autor.

5.2.4 TBARS

Após a análise das substâncias resultantes da peroxidação lipídica que reagem com o ácido tiobarbitúrico, chegou-se à análise de 58 indivíduos no grupo cirrótico e 34 indivíduos no grupo controle. O valor médio encontrado para o grupo de pacientes foi de $6,64 \pm 3,12 \text{ } \mu\text{mol.mL}^{-1}$. Já o valor médio encontrado para o grupo controle foi de $4,98 \pm 3,73 \text{ } \mu\text{mol.mL}^{-1}$. Os dados não possuem distribuição normal, e o teste de hipótese utilizado foi o teste U de Mann-Whitney. O valor de p encontrado foi de $p < 0,05$. O gráfico com mediana e quartis pode ser visto na figura 17.

Figura 17: Gráfico indicando a mediana, quartis e limites da variável TBARS.



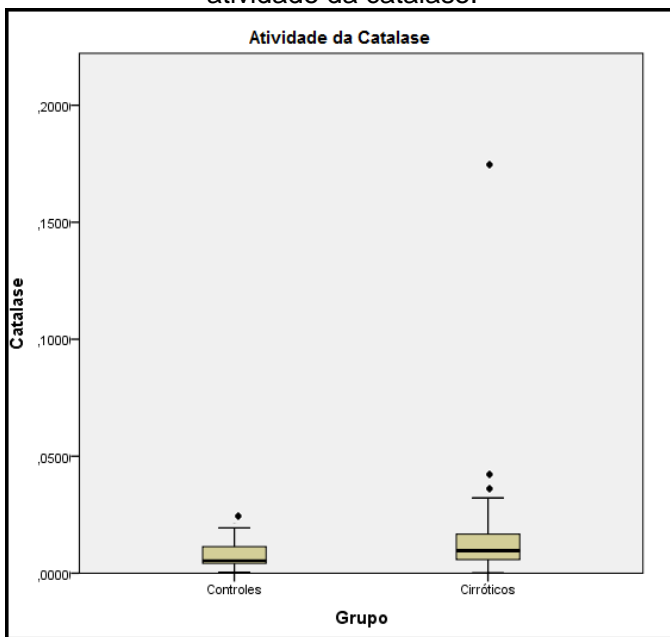
O valor de p encontrado foi de $p < 0,05$ (*). Fonte: O Autor.

5.2.5 Catalase

Para a análise da Catalase, chegou-se ao número final de 49 indivíduos analisados no grupo de pacientes cirróticos e 12 indivíduos analisados no grupo controle. A atividade encontrada no grupo de pacientes foi de $0,0158 \pm 0,025 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. No grupo controle o valor médio encontrado foi de $0,0082 \pm 0,007 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Os dados não possuem distribuição normal, e o teste de hipótese utilizado foi o teste U de Mann-Whitney. O valor de p encontrado foi de $p = 0,11$. O gráfico pode ser observado abaixo, na figura 18.

Figura 18: Gráfico indicando a mediana, quartis e limites da

atividade da catalase.



Os valores outliers são indicados por pontos. Valor de $p = 0,11$.

Fonte: O Autor.

5.2.6 Correlações

Para a análise de correlações entre as diferentes variáveis do grupo de pacientes cirróticos, foi utilizado o teste de Correlações de Spearman. Foram encontradas correlações entre os valores de TBARS e o número de pontes, o número de pontes e o número de brotos nucleares, o valor de índice mitótico e o número de brotos nucleares. Além disso, foi encontrada uma tendência de correlação entre o valor de TBARS e o número de brotos nucleares.

Entre o TBARS e o número de pontes, foi encontrada uma correlação regular, com o valor de r sendo 0,315 e o valor de significância sendo 0,035. Entre TBARS e o número de buds, houve um valor de significância encontrado de 0,066, indicando uma tendência de significância, e com o valor de r encontrado de 0,27, o que configura uma tendência de correlação regular. Entre o número de pontes e o número de brotos nucleares, o valor de significância encontrado foi de 0,000067, e o valor de r encontrado foi de 0,53, indicando uma correlação moderada entre as variáveis. Por fim, a última correlação encontrada foi entre o valor de índice mitótico e o número de buds, com o valor de significância sendo de 0,003, e o valor de r encontrado de -0,412, indicando uma correlação negativa entre os fatores. Os demais testes de correlações realizados não encontraram valores significantes. A Tabela 1, abaixo, resume os valores significantes encontrados. Ainda, na tabela 2, pode-se observar o resumo de todos os valores e significâncias encontradas.

Tabela 1: Tabela de correlações com os valores mais significativos.

Tabela de Correlações				
	Pontes/ TBARS	TBARS/ Brotos	Pontes/ Brotos	Índice Mitótico/ Brotos
Significância	0,035*	0,066	0,000067*	0,003*
Valor de r	0,315	0,27	0,53	-0,412

*Diferença estatística significativa

Tabela 2: Valores estatísticos encontrados em ambos os grupos de estudo.

Resumo dos valores encontrados									
	Número Individuos	Média	Desvio Padrão	Mediana	Valor Mínimo	Percentil 25	Percentil 75	Valor Máximo	Significância
Idade	62/35	56,05/ 52,11	9,51/ 13,3	57/53	24/26	50/44	63,25/ 62	78/78	
Micro- núcleos	49/35	14,75/ 10,54	5,47/ 5,68	14/11	4/3	10,5/5	17,5/14	29/29	0,002*
Pontes	49/35	3,37/ 0,314	1,64/ 0,63	3/0	1/0	2/0	5/0	6/2	0,000*
Brotos	49/35	3,98/ 2,31	2,5/1,57	3/2	0/0	2/1	6/3	10/6	0,003*
Índice Mitótico	49/35	1,58/ 1,61	0,13/ 0,21	1,57/ 1,59	1,25/ 1,23	1,50/ 1,45	1,69/ 1,75	1,92/ 2,17	0,552
Cometa	42/39	21,16/ 8,8	14,93/ 14,8	17/4	2/0	10,75/1	31,25/ 11	62/76	0,000*
TBARS	58/34	6,64/ 5,10	3,00/ 3,03	5,87/ 4,52	2,33/ 1,55	4,13/ 2,51	9,24/ 6,42	15,47/ 11,84	0,012*
Catalase	49/35	0,016/ 0,008	0,025/ 0,007	0,010/ 0,005	0,00009/ 0,0003	0,006/ 0,004	0,017/ 0,011	0,178/ 0,023	0,11

As informações estão organizadas do modo Pacientes/Controles. A presença de * indica diferença estatística encontrada.

6 DISCUSSÃO

Com exceção dos resultados de Índice Mitótico e da atividade da Catalase, em todos os demais resultados foi possível observar diferença estatística significativa na distribuição de valores entre o grupo controle e o grupo de pacientes cirróticos.

Além destes resultados estarem de acordo com a literatura, faz todo sentido biológico a observação destas diferenças. Como citado anteriormente neste trabalho, o fígado é um órgão considerado essencial para a homeostase do indivíduo, pois tem inúmeras funções dentre os milhares de processos fisiológicos que acontecem no nosso organismo. É esperado que um dano tão grave quanto o que ocorre em pessoas cirróticas produza consequências no organismo do indivíduo, não ficando esses efeitos confinados ao fígado.

Um dos efeitos observados em outras pesquisas, e que possui implicações diretas sobre as premissas deste estudo, é a existência de inflamação crônica tanto no órgão quanto sistêmica. Em uma revisão feita por Martínez-Esparza *et al.*, publicada em novembro de 2015, foram verificados trabalhos realizados em humanos apenas e que verificaram o status inflamatório local e sistêmico do indivíduo. O trabalho focou em duas etiologias para a cirrose dos indivíduos: a infecção pelo HCV e o consumo abusivo de álcool. Os trabalhos encontrados publicados são coerentes entre si, e indicam que há sim um status inflamatório diferenciado nesses pacientes. Encontrou-se diversas citocinas pró-inflamatórias em níveis elevados nos indivíduos cirróticos, tanto nos portadores de uma ou de outra etiologia citada. Foram encontrados níveis elevados de Fator de Necrose Tumoral – α , Interleucina 6, Interleucina 17, fatores anti-inflamatórios e fatores produzidos em resposta a danos, como a Galectina. Já Clària e colaboradores (2016) analisaram os níveis de 29 citocinas presentes no plasma de indivíduos cirróticos, além do estado redox dos indivíduos, e compararam com um grupo de indivíduos saudáveis, mostrando que indivíduos cirróticos possuem níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias

circulantes e de dano oxidativo quando comparados com o grupo controle.

Esses resultados encontram-se dentro do esperado, pois quando há uma infecção por algum agente externo (neste caso pelo HCV), há a ativação da resposta imune, a fim de combater a infecção. Porém, esse desenvolvimento é lento, mas contínuo, implicando em uma ativação constante do sistema de defesa do organismo, e com a produção de citocinas ocorrendo de forma contínua. Como o desenvolvimento da infecção por HCV (e por HBV também) é um processo lento, e que pode levar anos até os seus efeitos danosos serem sentidos, há a existência desta inflamação persistente por muito tempo, levando os seus efeitos a serem sentidos e possíveis de serem mensurados de forma sistêmica. O mesmo ocorre com a cirrose alcoólica, porém de maneira diferente. O consumo abusivo de álcool de forma diária leva os hepatócitos a uma morte traumática, com a consequente deposição de colágeno nos locais antes ocupados por hepatócitos viáveis. Esta morte, em geral com fenótipo necrótico, ativa as células de defesa do indivíduo. Como este é um processo que, em geral, leva mais de dez anos para seus efeitos serem sentidos pelo indivíduo, pode-se verificar que há a existência de fatores indicativos de inflamação crônica, tanto local quanto sistêmica. Esta cascata de eventos (morte dos hepatócitos - ativação do sistema de defesa - inflamação crônica) é observada no processo cirrótico independente da etiologia existente, sendo agravada nos casos de infecção por HBV e HCV.

Sendo assim, a inflamação crônica é uma peça chave do trabalho, pois é por consequência dela que outros diversos efeitos são observados nas células do indivíduo. A começar pelo estresse oxidativo.

O estresse oxidativo, como descrito anteriormente, é o desbalanço entre a existência de moléculas pró e antioxidantes, com o predomínio das moléculas pró-oxidantes. Os importantes agentes responsáveis por este cenário são as moléculas antioxidantes, sendo as mais importantes as enzimas de defesa antioxidante, as quais podemos citar a Superóxido Dismutase, a Catalase e a Glutathione Redutase, e as moléculas pró-oxidantes, com o predomínio dos radicais superóxido e hidroxila.

Há descrito na literatura, em outras patologias e condições, uma relação estreita entre a existência de inflamação crônica e o cenário de estresse oxidativo. O cenário de estresse oxidativo, por sua vez, está relacionado ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes em resposta ao aumento da produção de radicais livres (Vasconcelos *et al.*, 2007).

Por este motivo, este trabalho partiu do pressuposto que seriam encontradas diferenças na atividade enzimática das enzimas da cadeia antioxidante presente nas células do sangue periférico de indivíduos cirróticos em comparação com indivíduos saudáveis, o que faria uma interface entre o estado de inflamação crônica e sistêmica que existe nesses indivíduos e os seus efeitos a longo prazo. Ainda, os danos decorrentes do estresse oxidativo podem ser mensurados através da medida de substâncias decorrentes da lipoperoxidação que reagem com ácido tiobarbitúrico (TBARS). Essas substâncias são produzidas em decorrência do estresse oxidativo, e quanto mais são produzidas, maior o estresse oxidativo a que o sujeito está exposto.

Para este trabalho, foi possível analisar apenas uma enzima da cadeia antioxidante, a Catalase, além de ser realizada a técnica TBARS. Esperava-se que houvesse diferença entre os grupos na atividade enzimática, bem como uma maior concentração de substâncias decorrentes da lipoperoxidação, ambos os casos com números maiores no grupo de pacientes cirróticos.

Para a técnica TBARS foi encontrada diferença estatística significativa entre os grupos. Houve, com um $p < 0,05$, uma diferença na distribuição de valores entre o grupo controle e o grupo de pacientes cirróticos. Esse resultado corrobora o que é encontrado na literatura, pois esses danos avaliados são decorrentes da peroxidação lipídica, que é um marcador de estresse oxidativo. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos que induziam a cirrose em ratos (Ferrari *et al.*, 2013) e em humanos com a doença, sendo cada estudo realizado com uma etiologia diferente (Aboutwerat *et al.*, 2003; Guo, Chen e Ko, 2013; Zhao *et al.*, 2011).

Por outro lado, a análise da atividade da enzima Catalase não encontrou diferença na distribuição de valores entre o grupo

controle e o grupo de pacientes cirróticos. Foi encontrado um valor de $p = 0,11$, o que nos obriga a aceitar a hipótese nula, de ausência de diferença entre os grupos. A literatura, por sua vez, apresenta resultados conflitantes para a atividade desta enzima. Um estudo de 2002, de Agnieszka Szuster-Ciesielska com pacientes em cirrose alcoólica compensada e pacientes com cirrose alcoólica descompensada mostrou aumento na atividade da catalase apenas no grupo de pacientes com cirrose compensada, não mostrando diferenças na comparação entre o grupo de pacientes com cirrose descompensada e o grupo controle. Já Mansurova *et al.* (2005), em um estudo com pacientes com cirrose causada por infecção pelo HCV e Namiduru *et al.* (2010), que utilizou como sujeitos de pesquisa indivíduos com cirrose causada pela infecção por HCV ou HBV, em ambos os estudos, detectaram a diminuição na atividade da Catalase nos grupos de pacientes cirróticos. Aliás, não apenas na atividade da catalase, mas também na atividade de diversas outras enzimas da cadeia antioxidante, enquanto que os marcadores de dano ocasionado por estresse oxidativo encontrados encontravam-se aumentados.

Em contrapartida, em um estudo realizado por Mirelle Farias e outros (2012) nesta mesma Universidade, foram avaliados marcadores de estresse oxidativo e a atividade de enzimas da cadeia antioxidante de indivíduos cirróticos e infectados por HCV revelou um aumento na atividade das enzimas da cadeia antioxidante Superóxido Dismutase, Catalase e Glutathione Peroxidase nessas pessoas. Ainda, este estudo realizou suplementação vitamínica na dieta desses indivíduos durante seis meses, com a adição de Vitamina C, Vitamina E e zinco. Após, foi novamente avaliada a atividade enzimática das enzimas acima mencionadas, e encontrou-se redução na atividade de todas elas, indicando que a suplementação vitamínica contribuiu para a atenuação do cenário de estresse oxidativo a que estes pacientes estão submetidos.

Como mencionado, este estudo teve a possibilidade apenas de estimar a atividade enzimática da Catalase, não sendo encontrados valores com significativa diferença entre os grupos. Porém, dos 97 indivíduos divididos nos dois grupos, apenas foi possível fazer a análise de 61 indivíduos, sendo

apenas 12 do grupo controle. Este baixo número de análises realizadas pode ser responsável pela ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos, visto que o p encontrado foi de 0,11.

Em adição a esses resultados, temos a medição de cinco parâmetros que podem indicar efeitos genotóxicos relacionados ao desenvolvimento da cirrose. O primeiro parâmetro a ser discutido é o obtido através da técnica do cometa, que mede os níveis de quebras de fitas simples e de fitas duplas no DNA de linfócitos do sangue periférico dos indivíduos. O resultado encontrado foi que a distribuição de dados foi estatisticamente diferente entre os dois grupos, sendo que podemos dizer que há maior índice de dano no grupo de pacientes cirróticos quando em comparação com o índice do grupo controle. Novamente, faz total sentido biológico o encontro desse resultado, pois podemos relacionar esse dano ao DNA ao cenário de estresse oxidativo a que esses pacientes estão submetidos. Ainda, há o agravante de alguns dos pacientes estarem infectados pelo HBV ou HCV, o que, por si só, fornece uma maior pressão aos componentes do núcleo celular, agravando o cenário de dano ao DNA que encontra-se presente nesses indivíduos.

Este resultado encontrado está em consonância com a literatura disponível, com estudos realmente mostrando maior índices de quebras ao DNA em pacientes cirróticos, se comparados com indivíduos saudáveis (Grossi *et al.*, 2008; Shawki *et al.*, 2014).

Além do teste do cometa, o segundo teste realizado a fim de determinar os níveis de danos ao DNA dos sujeitos da pesquisa foi o teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese. Desse teste, foram retirados quatro resultados que indicam ações distintas, mas que em último caso corroboram a ideia de que a condição enfrentada pelos indivíduos cirróticos colabora para elevar o dano ao DNA nessas pessoas.

Dos quatro parâmetros, três tiveram aumento no grupo de pacientes cirróticos: Número de micronúcleos, número de pontes nucleoplasmáticas e número de brotos nucleares.

No parâmetro número de micronúcleos, há diferença na distribuição de dados entre os dois grupos. Micronúcleos são fragmentos de cromossomos ou mesmo cromossomos inteiros

que, por consequência de algum erro ocorrido na fase de divisão celular, acabam não ficando acoplados a nenhum dos dois núcleos formados durante a divisão, sendo expulsos e formando uma estrutura semelhante em cor e em formato de um núcleo, porém com um tamanho bastante reduzido. Esses erros podem ser induzidos por agentes externos ou internos e, no caso de indivíduos cirróticos, acredita-se que a condição fisiológica dessas pessoas induza a uma maior formação de micronúcleos.

Novamente, acredita-se que há uma relação entre o cenário de estresse oxidativo e essa maior produção de micronúcleos, tendo os indivíduos que são infectados pelo HBV ou HCV um maior agravamento de sua condição. Leite *et al.* (2014), em seu estudo, encontrou resultados semelhantes, com um maior número de micronúcleos em pacientes infectados com HCV ou HBV.

Ainda considerando o artigo de Leite *et al.* (2014), foram analisados também o número de pontes nucleoplasmáticas e de brotos nucleares, sendo encontrada diferença no número de pontes nucleoplasmáticas entre o grupo de pacientes e o grupo controle, e também foram encontradas diferenças entre o grupo de pacientes infectados pelo HCV e o grupo controle. No presente trabalho, estes dois parâmetros também foram analisados, sendo encontrada diferença estatística significativa em ambos os casos entre o grupo de indivíduos cirróticos e o grupo controle.

Pontes nucleoplasmáticas são formadas também por erros na divisão celular, com a formação de cromossomos dicêntricos e a consequente impossibilidade de divisão normal da célula. A maior formação desse tipo de cromossomo aberrante é um indicativo de pressões internas ou externas que levam à quebra cromossômica, e consequentes danos irreparáveis à célula que sofre esta quebra (Thomas, Umegaki e Fenech, 2003). No caso deste presente estudo, esse maior número de pontes nucleoplasmáticas nos indivíduos cirróticos é decorrente da sua condição, e esse resultado pode se somar ao que já foi apresentado até agora, como o maior número de micronúcleos, maior dano medido pelo ensaio cometa e maior índice de lipoperoxidação que encontra-se presente nesses indivíduos.

Para completar, a existência de brotos nucleares é explicada pela superexpressão de alguns genes em decorrência de pressões externas, e o aumento do número de brotos nucleares nos pacientes com cirrose é mais um fator a se considerar, havendo grande relação entre a doença e esses fatores bioquímicos e genéticos descritos neste trabalho.

Esses resultados acima discutidos nos levam a considerar a importância das modificações moleculares e sistêmicas existentes em um indivíduo com falha hepática. O processo de desenvolvimento da cirrose é longo e, embora o protagonista desta condição seja o fígado, muitos efeitos sistêmicos são sentidos e encontram-se presentes, e isto pode ter um papel chave no estágio final da condição.

Um indivíduo com constante estresse oxidativo associado a elevados índices de danos celulares e danos ao material genético de suas células possui maiores chances de adquirir comorbidades a esta condição, sendo a mais grave delas o carcinoma hepatocelular, como destacado por Dutta e Mahato (2017).

Os testes de correlações realizados indicaram que há correlações entre o número de pontes nucleoplasmáticas e o número de brotos nucleares encontrados no grupo de pacientes cirróticos. Este é um dado interessante e esperado, pois o aumento de ambos os parâmetros está associado a uma maior pressão danosa ocorrente no núcleo celular. Os testes anteriores que comparavam grupos e variáveis de dano indicaram que há maior dano no grupo de pacientes cirróticos do que no grupo de indivíduos saudáveis, o que por si só já nos leva a inferir que existe uma maior pressão de dano no núcleo das células daqueles indivíduos. Esta maior pressão pode estar se manifestando com um maior número de quebras cromossômicas e formação de cromossomos dicêntricos, por exemplo, o que pode ser visualizado pela maior formação de pontes nucleoplasmáticas nos pacientes cirróticos. Ainda, esta pressão pode estar se manifestando com a superexpressão de genes que levam à maior produção de proteínas nucleares, que podem ser visualizadas através do maior número de brotos nucleares encontrados nos pacientes cirróticos. Ao interligar essas duas informações, a indicação de correlação entre as duas variáveis

acima citadas torna-se bastante plausível. O valor de r encontrado foi de apenas 0,53, o que pode ser considerado abaixo do esperado para esta situação.

Os valores de TBARS apresentaram correlação com o número de pontes e com o número de brotos nucleares. Em ambos os casos tivemos uma correlação encontrada ou tendenciosa, porém em ambos os casos o valor de r foi considerado regular (entre 0,25 e 0,5). O TBARS avalia a peroxidação lipídica, enquanto que o número de brotos e o número de pontes estão relacionados à danos nucleares e ao DNA. Esta correlação regular pode ser um indício que o estresse oxidativo tem sim importância frente ao dano ao DNA descrito, mas que não é o único e nem o mais importante fator a ser considerado nesta situação.

Por fim, o teste de correlações de Spearman encontrou uma correlação negativa ($r = -0,412$) entre o Índice Mitótico e o número de brotos nucleares nos pacientes com cirrose. Este resultado indica que, quanto maior o valor de Índice Mitótico do indivíduo, maior a tendência do número de brotos nucleares encontrados ser zero. Este resultado encontrado faz bastante sentido biológico, pois o Índice Mitótico é um valor que está relacionado à viabilidade celular e à sua capacidade de divisão. Quando encontra-se um fator que dificulta a correta divisão celular, este índice cai. E a correlação negativa entre o Índice Mitótico e um dos parâmetros que justamente indicam maior pressão de dano ao núcleo celular podem nos fazer inferir que esta é uma ligação importante no nosso cenário de cirrose.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo se propôs a responder algumas perguntas a respeito do cenário de estresse oxidativo e de dano ao DNA que acredita-se estar presente em pessoas que convivem com a cirrose descompensada, que é normalmente o estágio final da doença, quando há em geral um dano irreversível ao fígado desses pacientes e que leva muitos deles a óbito. As perguntas do trabalho eram se há um cenário de mais dano ao DNA e maior estresse oxidativo sistêmico nesses pacientes, quando comparados com os cenários de indivíduos saudáveis.

Os resultados indicam que existe maiores níveis de dano ao DNA e um cenário de maior estresse oxidativo nos pacientes cirróticos que participaram do estudo, quando em comparação com os indivíduos saudáveis analisados.

BIBLIOGRAFIA

ABDEL-MISIH, Sherif R. Z.; BLOOMSTON, Mark. Liver Anatomy. **Surgical Clinics Of North America**, [s.l.], v. 90, n. 4, p.643-653, ago. 2010.

ABOUTWERAT, Ali et al. Oxidant stress is a significant feature of primary biliary cirrhosis. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis Of Disease**, [s.l.], v. 1637, n. 2, p.142-150, mar. 2003.

AEBI, H. **Catalase in vitro**. Methods Enzymol, v. 105, p. 121-6, 1984.

ALMAZROO, Omar Abdulhameed; MIAH, Mohammad Kowser; VENKATARAMANAN, Raman. Drug Metabolism in the Liver. **Clinics In Liver Disease**, [s.l.], v. 21, n. 1, p.1-20, fev. 2017.

ASSY, N. et al. **Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats**. **Journal Of Laboratory And Clinical Medicine**, [s.l.], v. 131, n. 3, p.251-256, mar. 1998.

AUMÜLLER, G; AUST, G; DOLL A; ENGELE, J; KIRSCH, J; MENSE, S; REIßIG, D; SALVETTER, J; SCHMIDT, W; SCHMITZ, F; SCHULTE, E; SPANEL-BOTOWSKI, K; WOLFF, W; WURZINGER, L; ZILCH, H. **Anatomia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2009.

BAIK, Soon; FOUAD, Tamer R; LEE, Samuel S. Cirrhotic cardiomyopathy. **Orphanet Journal Of Rare Diseases**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.15-27, 2007

BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p.629-643, ago. 2010.

BASU, Debdatta; KULKARNI, Rajendra. Overview of blood components and their preparation. **Indian Journal Of Anaesthesia**, [s.l.], v. 58, n. 5, p.529-537, 2014.

BIRD, R. P.; DRAPER, H. H. **Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination**. Methods Enzymol, v. 105, p. 299-305, 1984.

BOLOGNESI, C.; CREUS, A.; WEGMAN, P.O.; MARCOS, R. Review: Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis* (2011), vol. 26 no. 1 pp. 19–26.

BOVERIS, A. et al. **Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats.** Arch Biochem Biophys, v. 227, n. 2, p. 534-41, Dec 1983.

BOWLUS, C.; GERSHWIN, M.. **The diagnosis of primary biliary cirrhosis.** Autoimmunity Reviews, [s.l.], v. 13, n. 4-5, p.441-444, abr. 2014

CAREY, J.; ALI, A; LINDOR, K. **Primary biliary cirrhosis.** The Lancet, [s.l.], v. 386, n. 10003, p.1565-1575, out. 2015.

CLÀRIA, Joan et al. Systemic inflammation in decompensated cirrhosis: Characterization and role in acute-on-chronic liver failure. **Hepatology**, [s.l.], v. 64, n. 4, p.1249-1264, 25 ago. 2016

CODES, Liana et al. **Hepatite aguda criptogênica: uma entidade heterogênea com possibilidades de complicações.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, [s.l.], v. 42, n. 4, p.293-298, ago. 2006.

CZAJA, Albert J. et al. **Genetic predispositions for the immunological features of chronic active hepatitis.** Hepatology, [s.l.], v. 18, n. 4, p.816-822, out. 1993.

CZAJA, Albert J.. **Transitioning from Idiopathic to Explainable Autoimmune Hepatitis.** Dig Dis Sci, [s.l.], v. 60, n. 10, p.2881-2900, 22 maio 2015.

DEBES, Jose D.; KNEGT, Robert J. de; BOONSTRA, Andre. The path to cancer, and back: Immune modulation during hepatitis C virus infection, progression to fibrosis and cancer, and unexpected roles of new antivirals.. **Transplantation**, [s.l.], p.1-7, dez. 2016

DIRCHWOLF, Melisa. Role of systemic inflammation in cirrhosis: From pathogenesis to prognosis. **World Journal Of Hepatology**, [s.l.], v. 7, n. 16, p.1974-1981, 2015

DUTTA, Rinku; MAHATO, Ram I.. Recent Advances in Hepatocellular Carcinoma Therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.263-269, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.010>. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725817300244>>. Acesso em: 14 fev. 2017.

FARIAS, Mirelle S. et al. Antioxidant supplementation attenuates oxidative stress in chronic hepatitis C patients. **Gastroenterología y Hepatología**, [s.l.], v. 35, n. 6, p.386-394, jun. 2012

FENECH, Michael. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 2, n. 5, p.1084-1104, maio 2007.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. **Measurement of micronuclei in lymphocytes**. Mutat Res, v. 147, n. 1-2, p. 29-36, Feb-Apr 1985.

FENECH, Michael. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 2, n. 5, p.1084-1104, maio 2007.

FERRARI, Renata Salatti et al. LUNG AND LIVER CHANGES DUE TO THE INDUCTION OF CIRRHOSIS IN TWO EXPERIMENTAL MODELS. **Arquivos de Gastroenterologia**, [s.l.], v. 50, n. 3, p.208-213, set. 2013.

FREIRE, Marcelo O.; VAN DYKE, Thomas E.. Natural resolution of inflammation. **Periodontology 2000**, [s.l.], v. 63, n. 1, p.149-164, 11 ago. 2013

GALLEGO, Carmen et al. Congenital and Acquired Anomalies of the Portal Venous System. **Radiographics**, [s.l.], v. 22, n. 1, p.141-159, jan. 2002.

GAETANI, Gian Franco et al. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Blood Journal**. Genoa, p. 334-339. jan. 1989

GAO, Bin; BATALLER, Ramon. Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and New Therapeutic Targets. **Gastroenterology**, [s.l.], v. 141, n. 5, p.1572-1585, nov. 2011

GAO, Li et al. Protocatechuic Aldehyde Attenuates Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury by Suppressing Nox-Mediated Oxidative Stress and Renal Inflammation. **Frontiers In Pharmacology**, [s.l.], v. 7, p.479-488, 6 dez. 2016

GANAI, Ajaz Ahmad et al. Regression of fibrosis/cirrhosis by Glycine propionyl-L-carnitine treatment in d-Galactosamine induced chronic liver damage. **Chemico-biological Interactions**, [s.l.], v. 260, p.117-128, dez. 2016

GEORGE, J., SHUKLA, Y. Review: Pesticides and cancer: Insights into toxicoproteomic-based findings. *Journal of proteomics* (2011), 74; 2713-2722.

GROSSI, Sarah et al. DNA damage in peripheral blood lymphocytes of patients with cirrhosis related to alcohol abuse or to hepatitis B and C viruses. **European Journal Of Gastroenterology & Hepatology**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.22-25, jan. 2008.

GUO, Chih-hung; CHEN, Pei-chung; KO, Wang-sheng. Status of Essential Trace Minerals and Oxidative Stress in Viral Hepatitis C Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **International Journal Of Medical Sciences**, [s.l.], v. 10, n. 6, p.730-737, 2013.

HAMASAKI, Naotaka; YAMAMOTO, Masaaki. Red Blood Cell Function and Blood Storage. **Vox Sanguinis**, [s.l.], v. 79, n. 4, p.191-197, dez. 2000.

JELKMANN, Wolfgang. The role of the liver in the production of thrombopoietin compared with erythropoietin. **European Journal Of Gastroenterology & Hepatology**. Germany, jul. 2001. p. 791-801

JINJUVADIA, R.; LIANGPUNSAKUL, S. Trends in Alcoholic Hepatitis-related Hospitalizations, Financial Burden, and Mortality in the United States. **Journal Of Clinical Gastroenterology**, [s.l.], p.506-511, jun. 2014.

JURICA, Jan et al. Bile acids, nuclear receptors and cytochrome P450. **Physiological Research**. Praga, out. 2016. p. 427-440.

KIASALARI, Zahra et al. Diosgenin ameliorates development of neuropathic pain in diabetic rats: Involvement of oxidative stress and inflammation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 86, p.654-661, fev. 2017

KRISHNA, Murli. Microscopic anatomy of the liver. **Clinical Liver Disease**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.4-7, mar. 2013

LEITE, Samantha Therezinha Almeida Pereira et al. Increased frequency of micronuclei in the lymphocytes of patients chronically infected with hepatitis B or hepatitis C virus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 109, n. 1, p.15-20, fev. 2014

LI, Yan et al. Genotoxicity and gene expression analyses of liver and lung tissues of mice treated with titanium dioxide nanoparticles. **Mutagenesis**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.33-46, 23 dez. 2016

LIANG, W. et al. **Mortality rate of alcoholic liver disease and risk of hospitalization for alcoholic liver cirrhosis, alcoholic hepatitis and alcoholic liver failure in Australia between 1993 and 2005.** *Internal Medicine Journal*, [s.l.], v. 41, n. 1, p.34-41, jan. 2011.

LIANGPUNSAKUL, S. **Clinical Characteristics and Mortality of Hospitalized Alcoholic Hepatitis Patients in the United States.** *Journal Of Clinical Gastroenterology*, [s.l.], v. 45, n. 8, p.714-719, set. 2011.

MAHESHWARI, A; RAY, S; THULUVATH, P. **Acute hepatitis C.** *The Lancet*, [s.l.], v. 372, n. 9635, p.321-332, jul. 2008. Elsevier BV.

MAHESHWARI, A.; THULUVATH, J.. **Management of Acute Hepatitis C.** *Clinics In Liver Disease*, [s.l.], v. 14, n. 1, p.169-176, fev. 2010.

MANSUROVA et al. Lipid peroxidation and anti-oxidative protection in patients with chronic type C hepatitis. **Klinicheskaia Meditsina**, Moskow, v. 5, n. 83, p.39-42, jun. 2005.

MARCUS, N. Y. et al. Oxidative stress contributes to liver damage in a murine model of alpha-1-antitrypsin deficiency. **Experimental Biology And Medicine**, [s.l.], v. 237, n. 10, p.1163-1172, 1 out. 2012

MARULLO, Rossella et al. **HPV16 E6 and E7 proteins induce a chronic oxidative stress response via NOX2 that causes genomic instability and increased susceptibility to DNA damage in head and neck cancer cells.** *Carcinogenesis*, [s.l.], v. 36, n. 11, p.1397-1406, 8 set. 2015.

MARTÍNEZ-ESPARZA, María. Inflammatory status in human hepatic cirrhosis. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 21, n. 41, p.11522-11541, 2015.

MOLLER, S; HENRIKSEN, J H. Cardiovascular complications of cirrhosis. **Gut**, [s.l.], v. 57, n. 2, p.268-278, 11 jan. 2008

MØLLER, Søren. Extrahepatic complications to cirrhosis and portal hypertension: Haemodynamic and homeostatic aspects. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 20, n. 42, p.20-42, 2014

NADIN, S. B. et al. **A silver staining method for single-cell gel assay**. J Histochem Cytochem, v. 9, p. 1183-6, 2001.

NAMdDURU, Emine S. et al. Antioxidant defense in patients with chronic viral hepatitis B and C type. **Clinical Laboratory**, [s L.], v. 6, n. 56, p.207-213, maio 2010

O'CONNOR, Mark j.. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. **Molecular Cell**, [s.l.], v. 60, n. 4, p.547-560, nov. 2015.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. **Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction**. Anal Biochem, v. 95, n. 2, p. 351-8, Jun 1979.

OHNO, M. et al. **Novel therapeutic approaches for hepatitis B virus covalently closed circular DNA**. **World Journal Of Gastroenterology**, Tokyo, v. 23, n. 21, p.7084-7088, jun. 2015.

PENA, Karina et al. The administration of a high refined carbohydrate diet promoted an increase in pulmonary inflammation and oxidative stress in mice exposed to cigarette smoke. **International Journal Of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, [s.l.], v. 11, p.3207-3217, dez. 2016

PENG, Hui; WISSE, Eddie; TIAN, Zhigang. Liver natural killer cells: subsets and roles in liver immunity. **Cellular And Molecular Immunology**, [s.l.], v. 13, n. 3, p.328-336, 7 dez. 2015

PERRI, Francesco; PISCONTI, Salvatore; SCARPATI, Giuseppina della Vittoria. P53 mutations and cancer: a tight linkage. **Annals Of Translational Medicine**, [s.l.], v. 4, n. 24, p.522-522, dez. 2016.

QI, Li et al. Methylation of the Glutathione-S-Transferase M3 Gene Promoter is Associated with Oxidative Stress in Acute-on-Chronic Hepatitis B Liver Failure. **The Tohoku Journal Of Experimental Medicine**, [s.l.], v. 228, n. 1, p.43-51, 2012

ROOS, Wynand P.; THOMAS, Adam D.; KAINA, Bernd. **DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology**. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.20-33, 18 dez. 2015.

SANDAHL, T. et al. **Incidence and mortality of alcoholic hepatitis in Denmark 1999–2008: A nationwide population based cohort study.** *Journal Of Hepatology*, [s.l.], v. 54, n. 4, p.760-764, abr. 2011.

SHAWKI, Shereen M. et al. Increased DNA Damage in Hepatitis C Virus-Related Hepatocellular Carcinoma. **Dna And Cell Biology**, [s.l.], v. 33, n. 12, p.884-890, dez. 2014

SIES, H.; JONES, D.. Oxidative Stress*. **Encyclopedia Of Stress**, [s.l.], p.45-48, 2007. Elsevier.

SILVEIRA, Keli Cristina Simões da et al. CIRRHOSIS INDUCES APOPTOSIS IN RENAL TISSUE THROUGH INTRACELLULAR OXIDATIVE STRESS. **Arquivos de Gastroenterologia**, [s.l.], v. 52, n. 1, p.65-71, mar. 2015

SINGH, N.P. et al. **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.** *Exp. Cell. Res.*, v. 175, p. 184-91, 1988.

SINGH, Narendra P. et al. White Light-mediated DNA Strand Breaks in Lens Epithelial Cells. **Experimental Eye Research**, [s.l.], v. 75, n. 5, p.555-560, nov. 2002

SKANDALAKIS, John E. et al. Hepatic surgical anatomy. **Surgical Clinics Of North America**, [s.l.], v. 84, n. 2, p.413-435, abr. 2004

STRNAD, Pavel et al. Liver — guardian, modifier and target of sepsis. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.55-66, 7 dez. 2016

SZUSTER-CIESIELSKA, Agnieszka; DANILUK, Jadwiga; KANDEFER-SZERSZEŃ, Martyna. Oxidative stress in the blood of patients with alcohol-related liver cirrhosis. **Medical Science Monitor**, Lublin, v. 6, n. 8, p.419-424, jun. 2002.

THOMAS, P.; UMEGAKI, K.; FENECH, M.. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutagenesis**, [s.l.], v. 18, n. 2, p.187-194, 1 mar. 2003.

TIAN, Hui et al. **DNA damage response – A double-edged sword in cancer prevention and cancer therapy.** *Cancer Letters*, [s.l.], v. 358, n. 1, p.8-16, mar. 2015.

TICE, R. R. et al. **Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing.** *Environ Mol Mutagen*, v. 35, n. 3, p. 206-21, 2000.

VILLELA, Izabel Vianna et al. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [s.l.], v. 605, n. 1-2, p.78-86, jun. 2006.

YOUNAS, Mehwish et al. Immune activation, smoking, and vaccine response. **Aids**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.171-173, jan. 2017

WANG, H. Joe et al. Inflammation in Alcoholic Liver Disease. **Annual Review Of Nutrition**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.343-368, 21 ago. 2012

WANG, H. et al. **DNA damage checkpoint recovery and cancer development. Experimental Cell Research**, [s.l.], v. 334, n. 2, p.350-358, jun. 2015.

WISSE, Eddie et al. On the Function of Pit Cells, the Liver-Specific Natural Killer Cells. **Seminars In Liver Disease**, [s.l.], v. 17, n. 04, p.265-286, 1997. Thieme Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-1007204>

WISNIEWSKA, E. et al. **Exposure to ethanol and tobacco smoke in relation to level of PCNA antigen expression in pancreatic and hepatic rat cells. Pharmacological Reports**, Bydgoszcz, v. 4, n. 65, p.914-926, abr. 2013.

ZHANG, Hong-xia et al. H₂S Attenuates LPS-Induced Acute Lung Injury by Reducing Oxidative/Nitrative Stress and Inflammation. **Cellular Physiology And Biochemistry**, [s.l.], v. 40, n. 6, p.1603-1612, 2016

ZHAO, Jinyan et al. Association between metabolic abnormalities and HBV related hepatocellular carcinoma in Chinese: A cross-sectional study. **Nutrition Journal**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.224-230, 15 maio 2011.

ANEXOS

Anexo 1. Aprovação por parte do Comitê de Ética do projeto no qual está inserido o presente estudo:



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CERTIFICADO Nº 1822

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 0584 GR.99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o contido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

APROVADO

PROCESSO: 1822 **FR:** 402205

TÍTULO: AVALIAÇÃO DE MARCADORES PROGNÓSTICOS EM PORTADORES DE CÍRROSE HEPÁTICA DESCOMPENSADA

AUTOR: Leonardo de Luca Schiavon, Esther Buzaglo Dantas Correa, Janaina Luz Narciso Schiavon, Maria Luiza Bazzo, Marcelo Ronsoni, César Lazzarotto

FLORIANÓPOLIS, 28 de Fevereiro de 2011.

Coordenador do CEPSH/UFSC